

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA VIEIRA PORSANI

**Otimização da produção de actinomicinas e potencial antimicrobiano e entomopatogênico de
Streptomyces longwoodensis isolado da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil.**

**CURITIBA
2015**

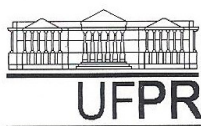
MARIANA VIEIRA PORSANI

**Otimização da produção de actinomicinas e potencial antimicrobiano e entomopatogênico de
Streptomyces longwoodensis isolado da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ida Chapaval Pimentel

CURITIBA
2015



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Otimização da produção de actinomicinas e potencial antimicrobiano e entomopatogênico de *Streptomyces longwoodensis* isolado da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, BR”

Por

MARIANA VIEIRA PORSANI

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel (presidente)

Prof. Dr. Leopoldo Clemente Baratto

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Cassilha Zawadneak

Dr^a. Renata Rodrigues Gomes

Dr. Alex Sandro Poltronieri

Curitiba, 27 de março de 2015.

Dedico,

*A “Deus”
e aos meus familiares;
ao Dorival, meu pai;
á minha mãe Renata;
meu irmão, Rafael
e meu sobrinho, Tobias
Por todo o amor, por quem sou e
por tudo que alcancei.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ele nasce de significativas contribuições que recolhi durante minha trajetória acadêmica.

Primeiramente eu gostaria de agradecer a todos os professores que passaram pela minha vida. Cada um deles contribuiu de forma única na minha formação acadêmica e pessoal. Dentre todos os professores que tive, alguns merecem um agradecimento especial.

A minha orientadora Professora Doutora Ida Chapaval Pimentel, a sua paixão pela microbiologia é muito contagiante sempre ensinando com muita paciência e disposição. Agradeço todo o conhecimento adquirido em microbiologia. Ao acolhimento em seu laboratório que tornou a pesquisa uma prática permanente na minha vida. Sempre serei grata por acreditar em mim e ter me dado à oportunidade de realizar este trabalho. Posso dizer com certeza que aprendi muito durante esses anos. A nossa parceria foi muito além do orientador-orientado; encontrei uma verdadeira amiga e conselheira.

A Professora Doutora Patricia Dalzoto pelo seu prazer em ensinar que está em seu amor pela docência sempre me apoiando e ajudando.

Ao Professor Doutor Brás Heleno de Oliveira pela co-orientação deste trabalho nos direcionando sempre da melhor maneira possível.

A Professora Doutora Maria Aparecida Zawadneak pela parceria e por estar sempre disposta a ajudar.

A Professora Doutora Lucy Ono pelo auxílio no ensaio de toxicidade e por todas as contribuições como banca avaliadora nas apresentações anuais dos relatórios.

A Professora Doutora Hedda E. Kolm pelos ensinamentos incomensuráveis, a quem devo o início deste trabalho quando coletamos os sedimentos marinhos na Ilha do Mel.

A Professora Doutora Vânia Vicente pelo seu exemplo de dedicação, sempre trabalhando de maneira exaustiva para o melhoramento do laboratório com equipamentos e todas as condições necessárias para o seu funcionamento.

Aos meus adorados pais aos quais devo meu caráter, Dorival Porsani e Renata V. Porsani, que sempre primaram pela minha educação e sempre estiveram presentes na minha vida nos momentos de alegrias, comemorando e tristezas me apoiando.

Ao companheiro de laboratório Dr. Alex Sandro Poltronieri pela amizade, por todo auxílio, conselhos, pelas idéias na elaboração dos experimentos, pela inteira disponibilidade para fazer a revisão dos textos, nos momentos difíceis do último ano e por cada gesto de apoio.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Patologia Básica, bem como aos colegas do laboratório LabMicro: Rafaela A., Carolina P., Germana, Patrícia, Gheniffer, Jason, Fábio, Eliana, Isabela, Elisa, Viviana, Bárbara, Rafaela, Mariana, Carolina A., Amanda.

Ao Doutor Leopoldo C. Baratto que não mediu esforços para me auxiliar.

Ao Asad Ullah que me ajudou nas avaliações dos experimentos de otimização.

A Doutora Renata Gomes pela grande ajuda nos experimentos envolvendo genética bacteriana.

Ao colega de turma Max pelo auxílio no experimento de genética bacteriana.

Aos estimados amigos de jornada Angela Bozza e Paulo Marangoni por todos esses anos de convívio e companheirismo

As amigas biólogas Cintia Palu, Dilza Trevisan, Fernanda Tanaka, Nathalia Yurika de Oliveira que sempre torceram por mim e pelos tantos momentos de alegrias compartilhados.

Ao Centro de Microscopia eletrônica de varredura (CME – UFPR)

Agradeço a agência financiadora deste projeto CAPES e ProExt MEC SESU.

*O Senhor é o meu pastor e nada me faltará.
Deita-me em verdes pastos e
guia-me mansamente em águas tranquilas.
Refrigera a minha alma,
guia-me pelas veredas da justiça,
por amor do seu nome.
Salmo 23*

RESUMO

Actinobactérias isoladas de regiões marinhas são um dos mais eficientes grupos produtores de metabólitos secundários. Muitos representantes da ordem Actinomycetales são prolíficos produtores de milhares de metabólitos secundários biologicamente ativos. Dessa forma, micro-organismos que se desenvolvem e disseminam na região entre-máres apresentam processos fisiológicos e produção de metabólitos secundários complexos e particulares. Neste trabalho, após isolamento de compostos com potencial antimicrobiano, fez-se necessária a otimização da obtenção de substâncias ativas, em meio de cultivo, com o intuito de alcançar um maior rendimento do produto. Dessa forma, a biossíntese de antibióticos envolve um grande número de etapas até chegar na produção em maior escala. A partir da actinobactéria Gram positiva, isolado *Streptomyces longwoodensis*/Genbank: JX997145, obteve-se os metabólitos em meio Sabouraud líquido. Foram testadas concentrações de 10, 50, 100, 250 e 500 µg/mL do extrato bruto com o objetivo de determinar a concentração inibitória mínima (MIC) contra as seguintes linhagens de referência: *Candida albicans* ATCC 10231 e bactérias como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e *Staphylococcus aureus* resistente. A análise dos resultados da macrodiluição indica que o extrato bruto possui potente atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, MRSA e *C. albicans*. As MICs observadas foram de 50 µg/mL para MRSA, 250 µg/mL para *S. aureus*, e 500 µg/mL para a *C. albicans*. A fim de otimizar a produção de biomassa da substância bioativa foi realizado um delineamento composto central (DCC). As melhores condições encontradas para a otimização da produção de biomassa foram: a temperatura de 30 °C; o tempo de cultivo 7,5 dias; o pH 5,2; dextrose 40 g/L e amido 40 g/L como fontes de carbono; extrato de levedura 10 g/L como fonte de nitrogênio. O caldo de fermentação foi submetido à técnicas cromatográficas diversas, utilizando-se solventes de polaridade adequada para o isolamento das substâncias de interesse. Os compostos isolados apresentam coloração alaranjada, são amorfos e solúveis em clorofórmio; os dados de ressonância magnética nuclear permitiram concluir que eles pertencem à classe das actinomicinas do complexo Z. Para avaliar os efeitos provenientes da interação entre as substâncias de interesse e uma linhagem celular, as células Vero (isolada a partir de tecido epitelial de rim de macaco) foram cultivadas em microplacas de 96 poços com duas séries de diluições dos compostos a diferentes concentrações, variando de 0,98-500 µg/mL e 1 % de DMSO. Neste ensaio de citotoxicidade realizado a amostra mostrou diferença significativa em relação ao controle, sem extrato, até a concentração mais baixa testada de 0,98 µg/mL em células Vero para 96 h de incubação, apresentou um $CC_{50} < 0,98 \mu\text{g/mL}$. Diante dos resultados obtidos neste ensaio preliminar, investigou-se a atividade biológica entomopatogênica. Os inseticidas químicos são amplamente utilizados na agricultura. No entanto, o uso excessivo destes químicos tem afetado a saúde humana, a poluição ambiental, danificando o ecossistema e favorecendo o desenvolvimento de resistência de organismos alvo como insetos e ácaros. A cultura da couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*) é acometida por infestações de diversas pragas, entre elas o pulgão *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae). Dessa forma, o controle biológico por bactérias entomopatogênicas é uma alternativa viável e pode ser utilizada visando à redução no uso de inseticidas químicos. A CL_{50} de $0,32 \times 10^6$ UFC/mL obtida para *S. longwoodensis* é um indicativo de sua ação entomopatogênica. Assim como a redução na excreção de *honeydew* verificada para *B. brassicae* pode indicar ação fagoderrente de *S. longwoodensis*. A actinobactéria isolada da região entre-marés apresenta potencial para produção de substâncias biologicamente ativas.

Palavras-chave: *Streptomyces*, sedimento marinho, compostos bioativos, antimicrobiano, entomopatógeno, controle biológico

ABSTRACT

Isolated actinomycetes of marine areas are one of the most efficient producers groups of secondary metabolites. Many representatives of the Actinomycetales order are prolific producers of thousands of biologically active secondary metabolites. Thus, microorganisms that develop and disseminate in the intertidal region have physiological processes and production complexes and particular secondary metabolites. In this work, after isolation of compounds with antimicrobial potential, it was necessary to optimize the achievement of active compounds in the culture medium in order to achieve a higher yield. Thus, the biosynthesis of antibiotics involves a number of steps to arrive at the larger scale production. From the Gram positive actinobacteria isolated *Streptomyces longwoodensis*/Genbank: JX997145, we obtained the metabolites in liquid Sabouraud. Extract concentrations were tested 10, 50, 100, 250 and 500 µg/mL in order to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) against reference strains as follows: *Candida albicans* ATCC 10231 and bacteria such as *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and resistant *Staphylococcus aureus*. The analysis of macro-dilution results indicates that the crude extract has potent antimicrobial activity against *S. aureus*, MRSA and *C. albicans*. The MICs were observed from 50 µg/mL for MRSA, 250 µg/mL for *S. aureus*, and 500 µg/mL for *C. albicans*. In order to optimize biomass production of bioactive substance was conducted a central composite design (CCD). The best conditions found for optimizing the production of biomass were: temperature 30 °C; the time cultivation 7.5 days; pH 5.2; dextrose 40 g/L and starch 40 g/L as carbon sources; yeast extract 10 g/L as nitrogen source. The fermentation broth was subjected to various chromatographic techniques, using suitable polar solvents for isolating substances of interest. The isolated compounds presented an orange color are amorphous and soluble in chloroform; nuclear magnetic resonance data showed that they belong to the class of actinomycins complex Z. To evaluate the effects from the interaction between the substances of interest and a cell line, Vero cells (isolated from epithelial tissue of monkey kidney) were grown in 96 well microtiter plates with two fold serial dilutions of compounds at different concentrations ranging from 0.98 to 500 µg/mL and 1 % DMSO. In this test, cytotoxicity results showed a statistically difference compared to the control without extract, to the lowest tested concentration of 0.98 µg/mL in Vero cells for 96 h of incubation, presented a $CC_{50} < 0.98 \mu\text{g/mL}$. Forward of results obtained in this preliminary study, we investigated the entomopathogenic biological activity. Chemical insecticides are widely used in agriculture. However, the excessive use of these chemicals has affected human health, environmental pollution, damaging the ecosystem and favoring the development of resistance of target organisms such as insects. The culture of kale (*Brassica oleracea* var *acephala*) is affected by infestations of various pests, including the aphid *Brevicoryne brassicae* (Homoptera: Aphididae). Thus, the biological control by entomopathogenic bacteria is a viable alternative and can be used in order to reduce the use of chemical insecticides. The LC_{50} of 0.32×10^6 UFC/mL obtained to *S. longwoodensis* is indicative of its entomopathogenic action. As the reduction in excretion of honeydew observed for *B. brassicae* antifeedant activity may indicate *S. longwoodensis* action. Isolated actinobacteria from intertidal region has potential for production of biologically active substances.

Keywords: *Streptomyces*, marine sediment, bioactive compounds, antimicrobial, entomopathogen, biological control

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	ANTIBIÓTICOS AROMÁTICOS.....	24
FIGURA 2	ETAPAS DA BIOSÍNTESE DE ANTIMICROBIANOS.....	25
FIGURA 3	MICROMORFOLOGIAS DE ACTINOBACTÉRIAS VISUALIZADAS EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	48
FIGURA 4	ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS LINHAGENS DE <i>Streptomyces</i> sp. ISOLADAS NESSE ESTUDO E DE LINHAGENS PRÓXIMAS DEPOSITADAS NO GenBank.....	50
FIGURA 5	ESTRUTURA DA ACTINOMICINA (R = OH, X _{0β} ; R = O, X ₂ ; R = H, D).....	51
FIGURA 6	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO DA ACTINOBACTÉRIA <i>S. longwoodensis</i> FASE MÓVEL CHCl ₃ :MEOH (95:5 V/V) REVELAÇÃO: VANILINA SULFÚRICA.....	52
FIGURA 7	ESPECTRO UV DA ACTINOMICINA X ₂	53
FIGURA 8	CROMATOGRAMA OBTIDO DA ANÁLISE POR CLAE DO EXTRATO BRUTO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE <i>S. longwoodensis</i>	54
FIGURA 9	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO EM CÉLULAS VERO APÓS 96 h DE INCUBAÇÃO À 37 °C E 5 % DE CO ₂ PELO ENSAIO MTT.....	55
FIGURA 10	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE ACTINOMICINA X ₂ EM CÉLULAS VERO APÓS 96 h DE INCUBAÇÃO À 37 °C E 5 % DE CO ₂ PELO ENSAIO MTT.....	55
FIGURA 11	MAPA DE CONTORNO EM FUNÇÃO DO pH, TEMPERATURA E TEMPO DE CULTIVO DE <i>S. longwoodensis</i>	56
FIGURA 12	INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO NA PRODUÇÃO DE ACTINOMICINAS X ₂ , DE X _{0β} POR <i>S. longwoodensis</i>	60
FIGURA 13	ETAPAS DESENVOLVIDAS PARA CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA DE <i>S. longwoodensis</i>	81

FIGURA 14	NÚMERO DE GOTAS DE <i>HONEYDEW</i> EXCRETADAS POR <i>B. brassicae</i> NO PERÍODO DE 12 h DE EXPOSIÇÃO À ACTINOBACTÉRIA ENTOMOPATOGENICA <i>S. longwoodensis</i>	84
-----------	---	----

LISTA DE TABELAS E QUADROS

QUADRO 1	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS IMPORTANTES PRODUZIDOS POR ACTINOBACTÉRIAS.....	20
QUADRO 2	OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MEMBROS DA CLASSE ACTINOBACTÉRIA.....	40
TABELA 1	VALORES UTILIZADOS NO DCC PARA TRÊS FATORES: pH, TEMPERATURA E TEMPO DE CULTIVO.....	47
TABELA 2	IDENTIFICAÇÃO POR CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E POR COMPARAÇÃO COM SEQUÊNCIAS 16S DE rDNA DE ACTINOBACTÉRIAS.....	49
TABELA 3	CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC) DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. longwoodensis</i>	56
TABELA 4	CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC) DE ACTINOMICINA X ₂ <i>S. longwoodensis</i>	57
TABELA 5	FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO E RESPOSTA DA BIOMASSA DE <i>S. longwoodensis</i>	59
TABELA 6	CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA DE <i>S. longwoodensis</i> OBTIDO SOBRE NINFAS COM 48 h DE IDADE DE <i>B. brassicae</i> APÓS 48 h DA EXPOSIÇÃO.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcoET - Acetato de etila

AMH - Ágar Müller-Hinton

ATCC - *American Type Culture Collection*

B.O.D - *Biological oxygen demand*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CC₅₀ - Concentração citotóxica 50 %

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CLAE - Cromatografia líquida de Alta Eficiência

CHCl₃ - Clorofórmio

CL₅₀ - Concentração Letal 50 %

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMH - Caldo Müller-Hinton

CIA - Clorofórmio Álcool Isoamílico

CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio

DCC - Delineamento Composto Central

DEPT - *Distortionless enhancement by polarization transfer spectra*

DMEM - Meio de cultura *Dubelcco's modified Eagle medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

dNTP - Deoxiribose nucleosídeo trifosfato

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

EM - Espectrometria de Massa

ESI-MS - *Electrospray ionization mass spectrometry*

FBS - Soro fetal bovino

GenBank - Banco de dados genéticos

GFP - *Green fluorescent protein*

IV - Espectroscopia de Infra-vermelho

LPD - Desidrogenase lipoamida

MeOH - Metanol

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MIC - Concentração mínima inibitória

MRSA - *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

MTT - brometo 3- (4,5 - dimetiltiazol - 2 - il) - 2,5 - difeniltetrazol

NCBI - *National Center Biotechnology Information*

pb - Pares de bases

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PEG - Polietilenoglicol

PKS - Policetídeos sintetases

rDNA - DNA ribossomal

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

TBE - Solução de Tris- Borato- EDTA

TMS - Tetrametilsilano

UR - Umidade relative

UFC - Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOLÓGICAMENTE ATIVAS PRODUZIDAS POR ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL, PR, BRASIL.....	16
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 METABÓLITOS DE ACTINOBACTÉRIAS.....	19
3.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DOS ISOLADOS PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS.....	23
3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) - MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAR A PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS.....	26
3.4 POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO DE ACTINOBACTÉRIA NO CONTROLE BIOLÓGICO.....	27
4 REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE ACTINOMICINA PRODUZIDA POR <i>Streptomyces longwoodensis</i> ISOLADO DA REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL, PR, BRASIL.....	36
1 INTRODUÇÃO.....	38
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POTENCIALMENTE PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS.....	39
2.1.1 Isolados de actinobactérias.....	39
2.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	39
2.1.3 Identificações de membros da classe actinobactéria	40

2.1.4	Sequenciamento da região 16S do rDNA.....	41
2.2	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	42
2.2.1	Obtenção de metabólitos secundários em meio líquido.....	42
2.2.2	Obtenção do extrato bruto.....	43
2.2.3	Isolamento e elucidação estrutural dos compostos bioativos.....	43
2.2.4	CLAE - Método analítico para quantificar a produção de substâncias antimicrobianas.....	44
2.3	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	44
2.4	MÉTODO DA MACRODILUIÇÃO (ADAPTAÇÃO DO MANUAL PADRONIZADO PELA CLSI M7-A6, 2003; <i>GOLD STANDARD</i> PARA A VERIFICAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA).....	45
2.4.1	Micro-organismos patogênicos utilizados.....	45
2.4.2	Método da Macrodiluição.....	45
2.5	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PELO ISOLADO PRODUTOR DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANA...	46
2.5.1	Planejamento experimental para três variáveis independentes.....	46
3	RESULTADOS	47
3.1	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POTENCIALMENTE PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS.....	47
3.2	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	51
3.3	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	54
3.4	MÉTODO DA MACRODILUIÇÃO (ADAPTAÇÃO DO MANUAL PADRONIZADO PELA CLSI M7-A6, 2003; <i>GOLD STANDARD</i> PARA A VERIFICAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA).....	56
3.5	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO ISOLADO PRODUTOR DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS.....	57
4	DISCUSSÃO	60
5	CONCLUSÕES	65
6	REFERÊNCIAS	66
CAPÍTULO 3 - AÇÃO ENTOMOPATOGÊNICA DE <i>Streptomyces longwoodensis</i> sobre <i>Brevicoryne brassicae</i> (HEMIPTERA: APHIDIDAE).....		76
1	INTRODUÇÃO	77

2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
2.1	CRIAÇÃO DE <i>Brevicoryne brassicae</i>	79
2.2	ACTINOBACTÉRIA.....	79
2.3	ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA DE <i>S. longwoodensis</i>	79
2.4	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR.....	81
3	RESULTADOS.....	82
3.1	CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA DE <i>S. longwoodensis</i>	82
3.2	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE <i>B. brassicae</i> EXPOSTOS A <i>S. longwoodensis</i>	83
4	DISCUSSÃO.....	84
5	CONCLUSÃO.....	87
6	REFERÊNCIAS.....	88
	APÊNDICE.....	98

CAPÍTULO 1

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOLOGICAMENTE ATIVAS PRODUZIDAS POR ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL, PR, BRASIL.

1 INTRODUÇÃO GERAL

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas, com alto conteúdo de citosina e guanina em seu genoma e basicamente são encontradas no solo, crescem em uma rede de filamentos ramificados, chamado micélio, muito similar ao formado por fungos (VENTURA *et al.*, 2007). Segundo Raju *et al.* (2010), actinobactérias são encontradas em uma vasta variedade morfológica, como cocos (*Micrococcus*) ou cocobacilo (por ex., *Arthrobacter*), há fragmentação de hifas, como em *Nocardia* spp., e ainda podem possuir micélio ramificado (por exemplo, *Streptomyces* spp.). São degradadoras da matéria orgânica como celulose, lignina e quitina, gerando biomassa proteica ou mesmo servindo como alimento para outros organismos (GAVA *et.al.*, 2002).

Actinobactérias provenientes de ambiente marinho são eficientes produtores de metabólitos secundários, sendo muito importantes para indústria devido à diversidade estrutural e atividades biológicas. Muitos representantes da ordem Actinomycetales são produtores de milhares de metabólitos secundários biologicamente ativos (DEMAIN, 2006; LU *et al.*, 2009). Os compostos bioativos obtidos a partir de actinobactérias possuem estruturas químicas distintas que podem formar a base para a síntese de novos fármacos que poderiam ser utilizadas no combate de patógenos resistentes. O crescente avanço da ciência e da tecnologia permite o descobrimento de novos compostos bioativos sintetizados por actinobactérias a partir de várias fontes marinhas (MANIVASAGAN *et al.*, 2014).

O Brasil tem uma das maiores costas marítimas do mundo, com diversos ecossistemas e microhabitats. No entanto, são escassos os estudos sobre as substâncias isoladas e a atividade biológica de produtos obtidos de organismos marinhos coletados ao longo dos 7500 km de litoral brasileiro (PINTO *et al.*, 2002).

As regiões entre-marés, compreendidas entre o nível da maré baixa e o da maré alta, apresentam condições consideradas extremas, devido aos ciclos das ondas, resultando em gradientes de umidade, temperatura, radiação UV, nutrientes e salinidade (HUNT, BRYAN, MULLARNEY, 2015). Tais condições favorecem o desenvolvimento e a disseminação de alguns micro-organismos com processos fisiológicos e metabólitos particulares (UDWARY, 2007). Estes organismos têm demonstrado um grande potencial para a inovação em diversos setores biotecnológicos, devido a produção de metabólitos secundários, biopolímeros, lipídios e enzimas. No entanto, há um número limitado de micro-organismos da região entre-marés sendo avaliados em termos biotecnológicos, quando comparado com o número de micro-organismos estudados que se originam de outros habitats extremos, como regiões abissais marinhas e desertos (ORTEGA-MORALES, 2010).

Para se obter compostos a partir de micro-organismos em quantidades suficientes para realização de testes biológicos é necessário elevar o rendimento dos metabólitos (YU *et al.*, 2008). Dessa forma, a otimização dos requisitos de fermentação e meios de cultivo permitem alcançar maior produção de biomassa e alto rendimento do extrato bruto (NANJWADE, 2010).

Em PORSANI *et al.*, (2013) e PORSANI, (2007) foram selecionados 116 isolados de actinobactérias identificadas como *Streptomyces* e *Nocardia*, por meio de técnicas convencionais de cultivo. Dentre estes, 79 isolados tiveram atividade antimicrobiana contra pelo menos uma linhagem patogênica (TABELA 1 – Apêndice) (PORSANI-AZUMA, 2011). Dentre as 79 actinobactérias que apresentaram atividade antimicrobiana, foram selecionadas aquelas que tiveram halo de inibição maior que 20 mm de diâmetro. E dentre estes isolados, aquele que se destacou foi *Streptomyces longwoodensis*; esta linhagem foi cultivada em meio líquido para a obtenção dos metabólitos secundários, os extratos obtidos foram caracterizados quimicamente e otimizados para obtenção destes compostos bioativos.

Para avaliar os efeitos provenientes da interação entre as substâncias de interesse e uma linhagem celular utilizou-se as células Vero (DENIZOT, LANG, 1986). Neste ensaio de citotoxicidade, houve diferenças significativas em relação ao controle, sem extrato, onde a concentração mais baixa testada apresentou alteração na morfologia normal das células. Diante disso, investigou-se a atividade biológica entomopatogênica.

Muitas espécies de actinobactérias, como as pertencentes ao gênero *Streptomyces*, são conhecidas como agentes de biocontrole. O controle biológico de pragas têm sido frequentemente utilizado em países tropicais, como o Brasil, e é apoiado pelo desenvolvimento de pesquisa básica e aplicada local (LACAVA; AZEVEDO, 2014).

Neste contexto, a cultura da couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*) é acometida por infestações de diversas pragas, entre elas o pulgão *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae). O uso de inseticidas químicos é um dos métodos mais utilizados para seu controle, entretanto o controle biológico por bactérias entomopatogênicas é uma alternativa viável e pode ser utilizada visando à redução no uso de inseticidas químicos (PELL *et al.*, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial biotecnológico de actinobactérias isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil para a produção de substâncias biologicamente ativas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as actinobactérias com potencial antimicrobiano analisando as características macro e micromorfológicas e por meio de sequenciamento do DNA ribossomal 16S;
- Caracterizar e quantificar os metabólitos secundários presentes no extrato bruto;
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos compostos isolados de actinobactérias contra micro-organismos patogênicos: bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e levedura;
- Otimizar a obtenção do extrato bruto ativo e a produção dos metabólitos secundários das actinobactérias;
- Avaliar o potencial entomopatogênico da actinobactéria mais eficiente para o controle biológico do pulgão da couve *Brevicoryne brassicae*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 METABÓLITOS DE ACTINOBACTÉRIAS

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas, com alto conteúdo de citosina e guanina em seu genoma e basicamente são encontradas no solo, crescem em uma rede de filamentos ramificados, chamado micélio, muito similar ao formado por fungos (VENTURA *et al.*, 2007). Segundo Raju *et al.* (2010), actinobactérias são encontradas em uma vasta variedade morfológica, como cocos (*Micrococcus*) ou cocobacilo (por ex., *Arthrobacter*), há fragmentação de hifas, como em *Nocardia* spp., e ainda podem possuir micélio ramificado (por exemplo, *Streptomyces* spp.). São degradadoras da matéria orgânica como celulose, lignina e quitina, gerando biomassa proteica ou mesmo servindo como alimento para outros organismos (GAVA *et.al.*, 2002).

Actinobactérias isoladas de ambiente marinho são um dos mais eficientes grupos produtores de metabólitos secundários. Muitos representantes da ordem Actinomycetales são prolíficos produtores de milhares de metabólitos secundários biologicamente ativos. Actinobactérias obtidas de fontes terrestres foram estudados, por pesquisadores desde 1950, para muitos antibióticos importantes, antitumorais e agentes imunossupressores (DEMAIN, 2006; LU *et al.*, 2009). No entanto, o isolamento e caracterização dos compostos de actinobactérias provenientes de ambiente terrestre tornou-se menos atraentes nos últimos anos. Ao mesmo tempo, actinobactérias isoladas a partir do ambiente marinho têm recebido maior atenção devido à diversidade estrutural e atividades biológicas únicas de substâncias originadas do seu metabolismo secundário (MANIVASAGAN *et al.*, 2014).

O metabolismo secundário caracteriza-se pela produção de substâncias durante o estágio subsequente à fase de crescimento rápido. A produção destes metabólitos começa quando o crescimento é limitado pela exaustão de nutrientes como carbono, nitrogênio e fosfato (MAHAESHWARI *et.al.*, 2010).

O metabolismo secundário de micro-organismos pode ser descrito como a produção de compostos que aparentemente não exercem uma função para o organismo, já que este pode sobreviver mesmo sem a sua formação. Assim, uma das justificativas para a produção destas substâncias seria que, por ser produzido por uma série de reações bioquímicas que ocorrem nas células, quando o resultado é um produto que favorece a sobrevivência, este mecanismo é

incorporado às reações primárias. Isso é observado, por exemplo, nos pigmentos, que protegem contra os danos da luz ultravioleta. Além de que, ao se esgotar um nutriente vital, o metabolismo secundário manteria os mecanismos essenciais para a multiplicação celular, ativando outras vias para a sua produção, principalmente à produção de enzimas (ZHANG, 2012).

Estruturalmente e funcionalmente diversos compostos bioativos têm sido isolados deste grupo de procariotos com atividade biológica (QUADRO 1). Tais compostos são importantes, não somente como fármacos, mas também como compostos a partir dos quais, por modificações estruturais, obtêm-se outros derivados (MAHAESHWARI *et al.*, 2010).

Atividade biológica	Metabólito secundário	Produtor
Antibacteriano	Streptomicina Cloranfenicol Canamicina Tetraciclina Eritromicina Rifampicina Gentamicina Abissomicina	<i>Streptomyces griseus</i> <i>Streptomyces venezulae</i> <i>Streptomyces kanamyceticus</i> <i>Streptomyces rimosus</i> <i>Saccharopolyspora erythraea</i> <i>Amycolatopsis mediterranei</i> <i>Micromonospora</i> sp. <i>Verrucosisspora</i> sp.
Antifúngico	anfotericina B Candidicina Nistatina	<i>Streptomyces nodosus</i> <i>Streptomyces griseus</i> <i>Streptomyces noursei</i>
Antiviral	Fattiviricina	<i>Streptomyces</i> sp.
Inseticida e antiparasítico	Avermectina Milbemicina	<i>Streptomyces avermetilis</i> <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
Anticâncer	actinomicina D Bleomicina mitomicina D Salinosporamida	<i>Streptomyces antibioticus</i> <i>Streptomyces verticillus</i> <i>Streptomyces levendulae</i> <i>Salinospora</i>
Anticolesterolêmico	Pravastatina	<i>Streptomyces carbophilus</i>
Promotor de crescimento	Monensina Tilosina	<i>Streptomyces cinnamomiensis</i> <i>Streptomyces fradiae</i>
Herbicida	Bialophus	<i>Streptomyces fradiae</i>
Imunossupressivos	Rapamicina tacrolimus (FK 506)	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> <i>Streptomyces</i> sp.
Pigmentos	Actinorhodina Prodigiosina	<i>Streptomyces</i> <i>Streptoverticillium</i> sp.

QUADRO 1 - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS IMPORTANTES PRODUZIDOS POR ACTINOBACTÉRIAS

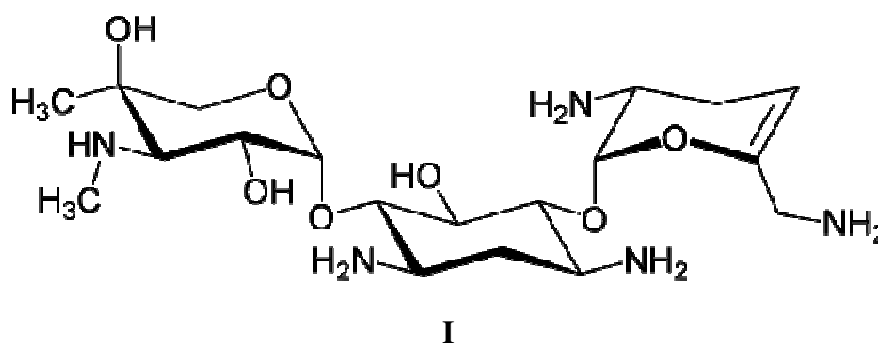
Fonte: MAHAESHWARI *et al.*, 2010

A busca de novos produtos farmacêuticos continua a exigir esforços e hoje muitos medicamentos produzidos foram, originalmente, derivados de fontes naturais, como plantas e

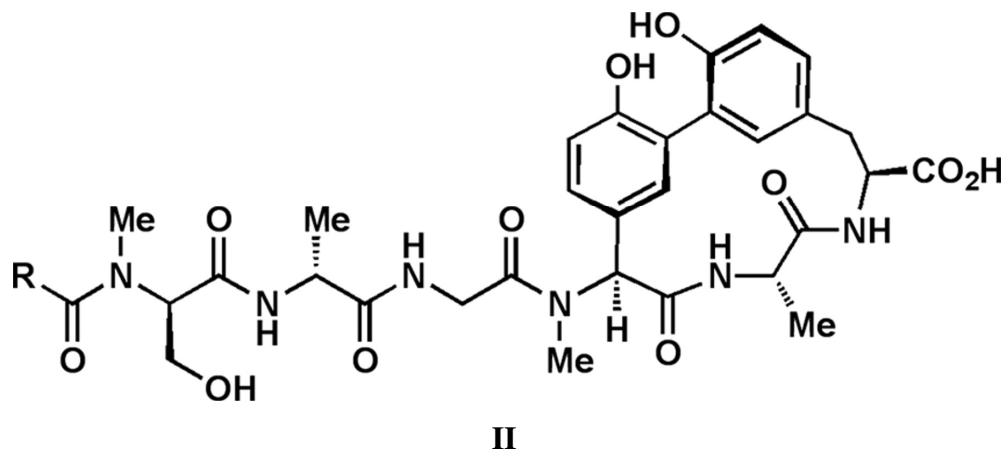
micro-organismos. Embora existam poucos produtos de origem marinha que são utilizados medicinalmente, estes são fonte potencial de produtos farmacêuticos (FENICAL, 2007).

As vantagens, segundo ZHANG (2005), atribuídas à descoberta de fármacos baseados em produtos naturais em relação à química sintética são: oferecem diversidade química com complexidade estrutural; foram selecionadas pela natureza através de interações biológicas específicas; são ainda inexplorados e as novas descobertas levará a novos compostos bioativos, ainda podem orientar a síntese de compostos sintéticos.

Alguns exemplos de produtos naturais obtidos a partir de micro-organismos podem ser encontrados em estudos realizados por LU (2009), onde uma linhagem de actinobactéria, isolada a partir de uma amostra de sedimento no litoral da China, apresentou atividade antimicrobiana de amplo espectro e produziu sisomicina (I), pela primeira vez identificada em actinobactérias, indicando que esta linhagem sofreu adaptação ao ambiente marinho e apresentou alta tolerância à concentração de NaCl.

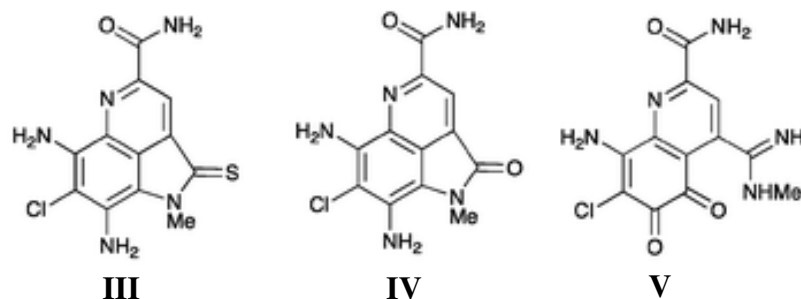


Em outro estudo, a espécie *Streptomyces parvus* produziu compostos arilomicinas (II) que inibiram a enzima peptidase e apresentaram potencial antibiótico de amplo espectro para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (JIN *et al.*, 2012; RAO *et al.*, 2012).

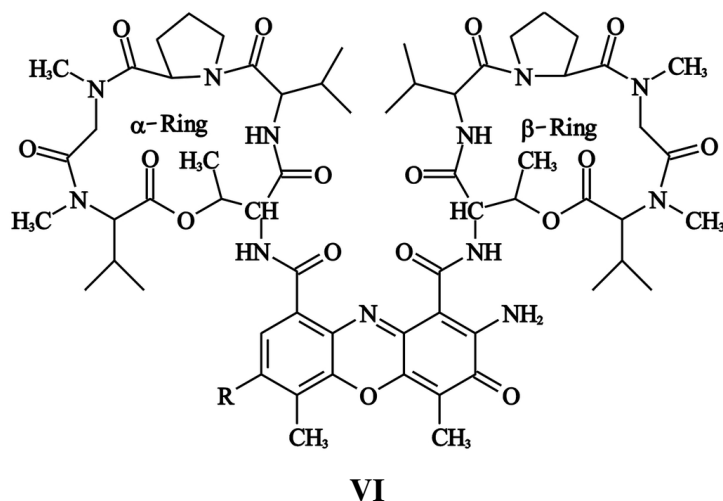


Em esforços contínuos para procurar produtos naturais a partir de bactérias marinhas com citotoxicidade seletiva contra linhagens celulares de câncer, Pan *et al.* (2012), obtiveram uma

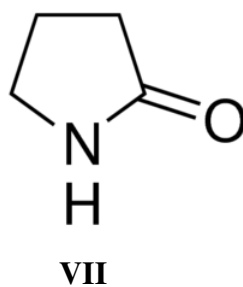
série de frações derivadas da actinobactéria marinha *Streptomyces variabilis*; a análise das frações ativas mostrou a presença de amosamidas A (III), B (IV), e também D (V).



Chen *et al.* (2012) investigaram a actinobactéria *Streptomyces avermitilis* para produção de actinomicina (VI) com atividade antimicrobiana para *Mycobactrium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* (ZHANG, 2005).



No estudo realizado por Sathiyarayanan (2013) aumentou-se a produção de compostos bioativos, a actinobactéria *Streptomyces* sp. teve seu processo fermentativo otimizado. A fração ativa foi caracterizada e foram identificados derivados de pirrolidona (VII) com amplo espectro de bioatividade sugerindo que esta actinobactéria apresenta potencial para produção de novas drogas antimicrobianas.



3.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DOS ISOLADOS PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

Segundo Madigan (2010) a maioria dos metabólitos secundários são moléculas orgânicas complexas, que requerem um grande número de reações enzimáticas específicas para sua síntese. A Figura 1 apresenta a principal via metabólica primária de síntese de aminoácidos aromáticos, com as vias secundárias de alguns antibióticos. Normalmente, os metabólitos secundários não são essenciais ao crescimento e reprodução do organismo produtor; sua síntese é altamente dependente das condições de cultivo, especialmente em relação à composição do meio e frequentemente são produzidos como um grupo de compostos estreitamente relacionados. Por exemplo, demonstrou-se que uma única linhagem de uma espécie de *Streptomyces* é capaz de produzir mais de 30 antibióticos quimicamente distintos, porém relacionados. Muitas vezes, os metabólitos secundários são produzidos em grandes quantidades; frequentemente por bactérias formadoras de esporos, durante o processo de esporulação (MADIGAN, 2010).

Durante a Segunda Guerra Mundial a demanda por quimioterápicos para tratar as infecções de ferimentos levou ao desenvolvimento de um processo de produção de penicilina e ao início da era dos antibióticos (PRADA, 2008). Esta área continua sendo na atualidade de grande importância na investigação da microbiologia industrial. O número de antibióticos continua aumentando, devido aos programas intensivos de busca em todos os países industrializados. Em 1961 eram conhecidos 513 antibióticos, 4.076 em 1972, 7.650 em 1985 e a partir de 2000 ao redor de 8.000 (LIMA *et al.*, 2001).

Estudos recentes sobre fermentação têm identificado a actinobactéria marinha do gênero *Salinispora* como produtora de uma substância, derivada do metabolismo secundário. Para avaliar o seu potencial biossintético foi sequenciado o genoma circular da actinobactéria *S. tropica* e foram analisados todos os agrupamentos de genes de produtos naturais identificáveis, mostrando que 9,9 % de seu genoma é utilizado para a síntese de produtos naturais, o que pode ser considerado uma grande porcentagem de seu genoma ao comparar com sequências do genoma do gênero *Streptomyces*, bem como de outras actinobactérias (UDWARY, 2007).

A otimização da produção de metabólitos secundários através do meio de cultivo e os requisitos de fermentação permite rapidamente alcançar um maior rendimento de extrato bruto e consequentemente do produto natural desejado (FIGURA 2). Como exemplo a otimização da produção de penicilina pela cepa isolada por Fleming proporcionou um aumento de 0,0012 g/L até aproximadamente 50 g/L, e ilustra bem o programa de melhoria do cultivo (LIMA *et al.*, 2001).

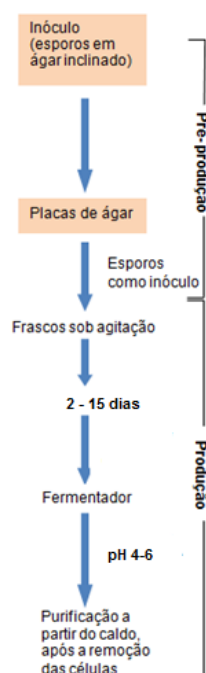


FIGURA 2: ETAPAS DA BIOSÍNTESE DE ANTIMICROBIANOS
Fonte: Madigan, 2010 modificado pelo Autor.

A espécie *Streptomyces rimosus* foi isolado de uma amostra de solo coletada no Nordeste da China. O efeito dos componentes do meio de cultivo (carbono e nitrogênio) e os requisitos essenciais para o cultivo (pH inicial e temperatura) sobre a produção de antimicrobianos por *S. rimosus* foi investigada. As melhores condições para a amostra cultivada foram pH inicial 6,0, temperatura média 28 °C, velocidade de agitação 180 rpm, tempo de crescimento do inóculo 4 dias, quantidade de inóculo 10 % e tempo de crescimento 120 h (YU *et al.*, 2008).

Portanto, para obter compostos a partir de micro-organismos em quantidades suficientes para realização de testes biológicos é imprescindível elevar o rendimento dos metabólitos (YU *et al.*, 2008). Dessa forma, é necessário otimizar cada componente do meio de fermentação, variando a concentração dos mesmos, para atingir uma produção máxima de antibióticos. O objetivo da otimização do meio de cultivo é investigar as condições de crescimento que produzem biomassa suficiente para produção de compostos (NANJWADE, 2010).

3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) - MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAR A PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

A Cromatografia é uma técnica de caracterização por separação, através de uma fase estacionária e outra móvel, enquanto o termo método cromatográfico define qual critério - natureza química, massa molar, estado físico - foi utilizado na cromatografia para a realização da separação. O nome da técnica foi atribuído pelo botânico russo M.S. Tswett, que, em 1906, usou colunas de adsorção em suas investigações sobre pigmentos de plantas. Ele criou o termo cromatografia, não se sabe se por ter separado pigmentos de colorações diferentes ou porque a palavra cor em russo é *tswett*. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido, disposto sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel pode ser gasosa, líquida, ou ainda, um fluido, que passa sobre a fase estacionária, arrastando os diversos componentes da mistura. Esta separação é resultante da diferença de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel devido às diferentes interações com a fase estacionária (SILVA, 2002).

Para o isolamento e quantificação de substâncias antimicrobianas são, sobretudo, utilizadas técnicas cromatográficas como CCD (Cromatografia em Camada Delgada) e CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). A CLAE é uma técnica de separação que, em menos de 30 anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e

quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, à possibilidade de separar espécies não-voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como às suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina (PATTO *et al.*, 2009). Como por exemplo, Mamatha *et al.* (2014) quantificaram estreptomicina por CLAE: para isso foi utilizado *Streptomyces griseus*, isolado do solo, para a produção de estreptomicina, um antibiótico potente de grande importância comercial, as análises realizadas permitiram aumentar a produção, eficiência e custo de estreptomicina em escala industrial.

A CLAE tem sido o principal método de detecção e quantificação empregado na determinação de tetraciclina e aminoglicosídeos. As técnicas de cromatografia líquida apresentam limites de quantificação adequados para a maioria dos antimicrobianos e podem chegar a valores na ordem de 0,3-0,5 µg/mL, sendo que o limite de detecção pode ser diminuído com o uso de detectores fluorimétricos, eletroquímicos e de espectrometria de massas (MAIA, 2009).

3.4 POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO DE ACTINOBACTÉRIA NO CONTROLE BIOLÓGICO

Inseticidas químicos são amplamente utilizados na agricultura. No Brasil o controle de pragas é feito com pesticidas de amplo espectro, como neonicotinoides, piretroides e organofosforados (MAPA, 2014). No entanto, o elevado uso destes inseticidas causam efeitos indesejáveis como a eliminação de inimigos naturais (BERNARDI, 2012), favorecendo o crescimento populacional de pragas (POLETTI *et al.*, 2008). Além do mais, o uso excessivo destes químicos também tem afetado a saúde humana, a poluição ambiental, danificando o ecossistema e favorecendo o desenvolvimento de resistência de organismos alvo como insetos e ácaros.

Como alternativa para a redução do uso de inseticidas químicos, antagonistas microbianos são utilizados para o controle biológico de pragas em plantas. O controle biológico de insetos e doenças que afetam as plantas cultivadas ganhou muita atenção nas últimas décadas como uma forma de reduzir o uso de pesticidas na agricultura. Neste contexto, micro-organismos entomopatogênicos, incluindo: bactérias, fungos, protozoários e vírus têm sido considerados como alternativas viáveis para o controle de pragas (CASTAGNOLA; STOCK, 2014). O controle

biológico tem sido frequentemente utilizado em países tropicais, como o Brasil, sendo apoiado pelo desenvolvimento de pesquisas básicas e aplicadas (LACAVA; AZEVEDO, 2014).

Atenção tem sido dada aos Actinomycetes, especialmente aos metabólitos secundários obtidos das espécies de *Streptomyces*, como alternativas para os agentes de controle biológico. Um novo metabólito policetídeo obtido do *Streptomyces* sp., isolado de ambiente marinho, mostrou significante atividades antinutricional, larvicida e inibitório de crescimento contra pragas polífagas (ARASU *et al.*, 2013). Além de pragas, o gênero *Streptomyces* tem potencial inibitório de fungos fitopatógenos caracterizados pela presença de quitina na parede celular. Samimifar *et al.* (2013) isolaram actinobactérias de solos, extraíram DNA genômico das amostras de *Streptomyces* e realizaram reações de PCR utilizando oligonucleotídeos marcadores de quitinase, para triagem de bactérias produtoras de quitinase que foram testadas para utilização como adubo biológico.

Vijayabharathi *et al.* (2014), identificaram um agente de biocontrole, de amplo espectro, eficiente no controle de lepidópteros. Um total de 111 micro-organismos foi isolado de áreas de cultivo orgânico e tiveram os seus metabólitos avaliados contra os primeiros estágios dos insetos. Destes, 15 actinobactérias apresentaram atividade inseticida para o segundo instar de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Os isolados de actinobactérias foram identificados por 16S rDNA e as espécies que mostraram atividade entomopatogênica contra os insetos foram *S. griseoplanus*, *S. bacillaris* e *S. albolongus*.

Na pesquisa realizada por Anwar *et al.* (2014), actinobactérias foram isoladas e seus compostos foram testados quanto à produção de insecticidas e larvicidas contra larvas de 3º instar de mosquitos *Culex quinquefasciatus* e *Tribolium castaneum*. Nesta triagem, os metabólitos de três isolados apresentaram 100 % de mortalidade das larvas testadas. Na caracterização química por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) e por CLAE-UV, os extratos brutos obtidos a partir da cultura destes isolados exibiram uma diversidade dos constituintes químicos. Os isolados selecionados foram identificados a partir de características morfológicas e sequenciamento do gene 16S rRNA apresentando similaridade genética com *Streptomyces rochei* (99 %), *Streptomyces minutiscleroticus* (98 %) e *Streptomyces phaeoluteigriseus* (92 %).

4 REFERÊNCIAS

ANWAR, S.; ALI, B.; QAMAR, F.; SAJID, I. Insecticidal Activity of Actinomycetes Isolated from Salt Range, Pakistan against Mosquitoes and Red Flour Beetle. **Pakistan Journal Zoology**, v. 46(1), p. 83-92, 2014.

ARASU, M. V; AL-DHABI, N. A.; SARITHA, V.; DURAIPANDIYAN, V.; MUTHUKUMAR, C.; KIM, S. J. Antifeedant, larvicidal and growth inhibitory bioactivities of novel polyketide metabolite isolated from *Streptomyces* sp. AP-123 against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **BioMed Central Microbiology**, v. 13, p.105, 2013.

BERNARDI, D.; GARCIA, M. S.; BOTTON, M.; CUNHA, U. S. Efeito da Azadiractina sobre *Chaetosiphom fragaefolli* (Cockereli, 1901) (Hemiptera: Aphididae) na cultura do morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 93-101, 2012.

CASTAGNOLA, A.; STOCK, P. Common virulence factors and tissue targets of entomopathogenic bacteria for biological control of lepidopteran pests. **Insects**, v. 5, p.139-166, 2014.

CHEN, C.; SONG, F.; WANG, Q.; ABDEL-MAGEED, W. M.; GUO, H.; FU, C.; HOU, W.; DAI, H.; LIU, X.; YANG, N.; XIE, F.; YU, K.; CHEN, R.; ZHANG, L. A marine-derived *Streptomyces* sp. MS499 produces high yield of actinomycin X₂ and actinomycin D with potent anti-tuberculosis activity **Applied Microbiology Biotechnology**, v.95. p. 919-927, 2012.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival – modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal Immunology Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DEMAIN, A. L. From natural products discovery to commercialization: a success story. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 33, p. 486-495, 2006.

GAVA, C. A. T.; PEREIRA, J. C.; FERNANDES, M. C.; NEVES, M. C. P. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.37 (10), 2002.

FENICAL, W. H. Antibiotic Drug Discovery from the New Marine Actinomycete Genus Marinomyces. **California Sea Grant College Program. Research Completion Reports**. 2007. Disponível em http://repositories.cdlib.org/csgc/rcr/NMP07_01. Acesso em: 06/10/2013.

HUNT, S.; BRYAN, K. R.; MULLARNEY, J. C. The influence of wind and waves on the existence of stable intertidal morphology in meso-tidal estuaries. **Geomorphology**, v. 228, p. 158-174, 2015.

JIN, X.; RAO, M.; WEI, W.; GE, M.; LIU, J.; CHEN, D.; LIANG, Y. Biosynthesis of new lipopentapeptides by an engineered strain of *Streptomyces* sp. **Biotechnology Letters**, v.34, p.2283-2289, 2012.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J.L. Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. **Advances in Endophytic Research**, 1ª Ed. p.231-256, India: Springer, 2014.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial. **Processos Fermentativos e Enzimáticos**. 1ª Ed. v. 3. São Paulo: Edgar Blücher, 2001.

LU, Y.; DONG, X.; LIU, S. BIE, X. Characterization and Identification of a Novel Marine Streptomyces sp. Produced Antibacterial Substance. **Marine Biotechnology**, v. 11(6), p. 717-724, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK. **Microbiologia de Brock**. 12^a Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAHESHWARI, D. K.; DUBEY, R. C.; SARAVANAMURTHU, R. **Industrial Exploitation of Microorganisms**. India: I.K. International Publishing House, 2010.

MAIA, P. P.; RATH, S.; REYES, F. G. R. Antimicrobianos em Alimentos de Origem Vegetal - Uma Revisão. **Revista Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 16(1). p. 49-64, 2009.

MAMATHA, J.; BHADRA, S.; MAHESH, M. Production of streptomycin from *Streptomyces griseus* under solid state fermentation, and ITS production enhancement by mutation and analysis by HPLC .**World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 3(8), p. 907-922, 2014.

MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K.; KIM, S. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. **Microbiological Research**. v. 169 (4), p. 262-278, 2014.

MAPA – Inseticidas recomendados para o manejo de *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera, Aphididae) em couve. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: < <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit>. Acesso em: 05/01/2015.

NANJWADE, B.; CHADRASHEKHARA, S.; GOUDANAVAR, P. S.; SHAMAREZ, A. M.; MANVI, F. V. Production of Antibiotics from Soil-Isolated Actinomycetes and Evaluation of their Antimicrobial Activities. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research August**, v. 9 (4), p. 373-377, 2010.

ORTEGA-MORALES, B. O.; CHAN-BACAB, M. J.; ROSA-GARCIA, S. C.; CAMACHO-CHAB, J. C. Valuable processes and products from marine intertidal microbial communities. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 346-352, 2010.

PAN, E.; JAMISON, M.; YOUSSEFUDDIN, M.; MACMILLAN. Ammosamide d from marine-derived *Streptomyces variabilis*. **Planta Medica**, v. 78, p. 126, 2012.

PATTO, D. C.; TAVARES, V. F.; PEREIRA, C. Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Revista Fármacos & Medicamentos**, v. 58, p. 36-40, 2009.

PELL, J.K; HANNAM, J.J; STEINKRAUS, J.J. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **Biological Control**, v. 55, p.187-198, 2010.

PINTO, A. C.; SIQUEIRA SILVA, D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

POLETTI, M.; COLLETTE, L. de P.; OMOTO, C. Compatibilidade de agrotóxicos com os ácaros predadores *Neoseiulus californicus* (McGregor) e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). **BioAssay**, v.3, n.3, p.14, 2008.

PORSANI -AZUMA, M. V. Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil. p.1 - 95, Dissertação de Mestrado em Microbiologia. Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

PORSANI, M. V. Variabilidade Espacial de Fungos da Região Entre-Marés da Ilha do Mel – Paraná. Monografia de graduação em Ciências Biológicas – Centro de Estudos do Mar. Universidade Federal do Paraná, 2007.

PORSANI, M.V.; AMATUZZI, R. F.; OLIVEIRA, B. H.; BARATTO, L. C.; DALITZ, C. A.; BOZZA, A.; MARANGONI, P. R.; DALZOTO, P.R.; KOLM, H. E.; PIMENTEL, I. Antimicrobial potential of fungi and actinobacteria isolated from sandy sediments of intertidal regions. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3(3) p.899-913, 2013.

PRADA, G. Impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo de la medicina contemporânea. **Revista de la Facultad de Medicina**, v. 16(1), p. 9-11, 2008.

RAJU, A.; PIGGOTT, A. M.; CONTE, M.; TNIMOV, Z.; ALEXANDROV, K.; CAPON, R. J. Nocardiopsins: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. **Chemistry European Journal**, v. 16, p. 3194-3200, 2010.

RAO, M.; JIN, X.; RUAN, L.; LUO, M.; SHENG, X. Identification of lipopeptide antibiotics and their biosynthetic gene cluster in *Streptomyces parvus* HCCB10043. **Chinese Journal of Pharmaceuticals**, v. 43(2), p. 92-96, 2012.

SAMIMIFAR, P.; DEHNAD, A.; EBRAHIMI, M. A.; KHANIKI, B.; TAHMASEBPOUR, B. The biological control of *Streptomyces* as an effective method for controlling plant diseases. **International Journal of Scholarly Research Gate**, v. 1 (4), p. 61-67, 2013.

SATHIYANARAYANAN, G.; GANDHIMATHI, R.; SABARATHNAM, B.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J. Optimization and production of pyrrolidone antimicrobial agent from marine sponge-associated *Streptomyces* sp. MAPS15. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 37, p.561-573, 2014.

SILVA, E. C. B. F.; SAMICO, T. M.; CARDOSO, R. R.; RABELO, M. A.; NETO, A. M. B.; MELO, F. L.; LOPES, A. C. S.; ACA, I. S.; MACIEL, M. V. Colonização pelo *Staphylococcus aureus* em profissionais de enfermagem de um hospital escola de Pernambuco. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.46 (1), p. 132-7, 2012.

UDWARY, D. W.; ZEIGLER, L.; ASOLKAR, R. N.; SINGAN, V.; LAPIDUS, A.; FENICAL, W. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104(25), p. 10376-10381, 2007

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71(3), p. 495-548, 2007.

VIJAYABHARATHI, R.; KUMARI, B. R.; SATHYA, A.; SRINIVAS, V.; ABHISHEK, R.; SHARMA, H. C.; GOPALAKRISHNAN, S. Biological activity of entomopathogenic actinomycetes against lepidopteran insects (Noctuidae: Lepidoptera). **Canadian Journal of Plant Science**, v. 94, p. 759-769, 2014.

YU, J. Q.; LIU, Q.; LIU, X.; SUN, Q.; YAN, J.; QI, X.; FAN, S. Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. **Revista Bioresource Technology**, v. 99, p.2087-2091, 2008.

ZHANG, Y.; MU, J.; FENG, Y.; KANG, Y.; ZHANG, J.; GU, P.J.; WANG, Y.; MA, L.F.; ZHU, Y.H. Broad-Spectrum Antimicrobial Epiphytic and Endophytic Fungi from Marine Organisms: Isolation, Bioassay and Taxonomy. **Marine Drugs**. v.7, p. 97-112, 2005.

ZHANG, X.; REN, K.; ZHANG, L. Screening and Preliminary Identification of Medicinal Plants Endophytic Actinomycetes Used for Inhibiting Penicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Biology**, v.4.(2), p. 119-124, 2012.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE ACTINOMICINA PRODUZIDA POR *Streptomyces longwoodensis* ISOLADO DA REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL, PR, BRASIL

RESUMO

As regiões entre-marés apresentam condições ambientais extremas que favorecem o desenvolvimento de micro-organismos produtores de metabólitos secundários complexos, como as actinobactérias. A partir do caldo de fermentação da actinobactéria Gram positiva *Streptomyces longwoodensis*/Genbank: JX997145 obteve-se o extrato bruto e suas frações por meio de técnicas cromatográficas, foram isoladas três substâncias, as quais foram purificadas e caracterizadas estruturalmente. Os dados de RMN permitiram concluir que estas substâncias pertencem à classe das actinomicinas do complexo Z. Para avaliar os efeitos provenientes da interação entre as substâncias de interesse foi utilizada uma linhagem celular, as células Vero. Neste ensaio de citotoxicidade, a amostra mostrou diferença significativa em relação ao controle ($CC_{50} < 0,98 \mu\text{g/mL}$), inclusive a concentração mais baixa testada apresentou alteração na morfologia normal das células. Foram testadas concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ do extrato com o objetivo de determinar a concentração inibitória mínima contra as seguintes linhagens de referência: *Candida albicans* ATCC 10231 e bactérias como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e *Staphylococcus aureus* resistente. O extrato bruto possui potente atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, MRSA e *C. albicans*. Com o intuito de alcançar um maior rendimento na produção de actinomicinas, foi realizada a otimização da produção do extrato bruto ativo. As melhores condições encontradas para a otimização da obtenção de biomassa foram: a temperatura de 30 °C; o tempo de cultivo 7,5 dias; o pH 5,2; dextrose 40 g/L e amido 40 g/L como fontes de carbono e extrato de levedura 10 g/L como fonte de nitrogênio. Os compostos isolados apresentam coloração alaranjada, são amorfos e solúveis em clorofórmio. *S. longwoodensis* é um excelente produtor de actinomicinas e pode ser um bom candidato para o desenvolvimento do processo de produção desses compostos.

Palavras-chave: Actinomicinas, região entre-marés, antimicrobiano, actinobactéria

ABSTRACT

The intertidal regions have extreme environmental conditions that favor the development of micro-organisms producers of complex secondary metabolites, such as actinomycetes. From the Gram positive actinobacteria *Streptomyces longwoodensis*/Genbank: JX997145 there was obtained the crude extract and fractions. NMR data showed that the substances isolated belong to the class of actinomycins complex Z. To evaluate the effects of the interaction between the substances of interest with a cell line, it was used Vero cells. In this cytotoxicity, assay the test sample showed a significant difference compared to control ($CC_{50} < 0.98 \mu\text{g/mL}$). Even the lowest concentration tested showed a change in the normal cell morphology. Extract concentrations were tested at 10, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ for the purpose of determining the minimum inhibitory concentration against the following reference strains: *Candida albicans* ATCC 10231 and bacteria such as *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and resistant *Staphylococcus aureus*. The crude extract has potent antimicrobial activity against *S. aureus*, MRSA and *C. albicans*. In order to achieve higher product yield, optimization of the production of active crude extract was performed. The best conditions found for optimizing the production of biomass were: temperature 30 °C; the time cultivation 7.5 days; pH 5.2; dextrose 40 g/L and starch 40 g/L as carbon source and yeast extract 10 g/L as nitrogen source. The isolated compounds presented an orange color, are amorphous and soluble in chloroform. *S. longwoodensis* is an excellent producer of actinomycins and may be a good candidate for the development production process of these compounds.

Keywords: Actinomycins, intertidal region, antimicrobial, actinobacteria

1 INTRODUÇÃO

A busca por novos princípios ativos para o desenvolvimento de fármacos tem levado pesquisadores a realizar bioprospecção de micro-organismos em ambientes marinhos (FENICAL, 2007). Muitos produtos farmacêuticos têm como substância ativa moléculas obtidas de fontes naturais como plantas e micro-organismos isolados de biomas terrestres. Entretanto, o isolamento e caracterização dos compostos provenientes de actinobactérias de ambiente terrestre tornaram-os menos atraentes nos últimos anos. Nesse sentido, micro-organismos de origem marinha apresentam fonte potencial para a descoberta de novos compostos bioativos, devido à diversidade estrutural e atividades biológicas únicas de substâncias originadas do metabolismo secundário destes organismos (MANIVASAGAN *et al.*, 2014).

As região entre-marés é caracterizada por alta salinidade, umidade, radiação UV, temperatura, ação mecânica das marés e escassez de nutrientes. Estas condições podem promover a produção de biopolímeros, lipídios e enzimas que possibilitam a sobrevivência destes micro-organismos nesse ambiente hostil (ORTEGA-MORALES, 2010).

Entre os micro-organismos, as actinobactérias são fontes importantes de novos compostos bioativos (DEMAIN, 2006; LU, 2009). Uma classe que se destaca como primeiro composto anticâncer isolado a partir de metabólitos de *Streptomyces* são as actinomicinas (DEMAIN *et al.*, 2009), que vêm sendo utilizada para tratamento de tumor de Wilms (FARBER *et al.*, 2002).

Embora os micro-organismos apresentem um elevado potencial na produção de moléculas bioativas, em contrapartida para obter compostos a partir de micro-organismos em quantidade suficientes para realização de testes biológicos é necessário adequar processos capazes de elevar o rendimento dos metabólitos (YU *et al.*, 2008).

A otimização da obtenção do extrato bruto ativo através do meio de cultivo e os requisitos de fermentação permite a obtenção de maiores quantidades dos produtos de interesse. Em Sajid *et al.* (2011), a otimização do processo de produção do metabólito, com atividade antifúngica, isolado da espécie *Streptomyces malachitofuscus* resultou em uma temperatura ótima de 35 °C e pH 7,8. *Streptomyces spectabilis*, isolado a partir de solo, produziu compostos ativos contra bactérias Gram-positivas e as melhores fontes nutricionais para o crescimento e produção de antibióticos foram glucose e peptona (HOLKAR *et al.*, 2013).

Neste contexto, as actinobactérias isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, que apresentaram potencial antimicrobiano foram identificadas a partir de características macro e

micromorfológicas e por sequenciamento do DNA ribossomal 16S. Foram caracterizados os compostos químicos presentes nos metabólitos secundários ativos extraídos, quantificadas as substâncias antimicrobianas e avaliado o potencial de actinobactérias em produzir substâncias biologicamente ativas contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e levedura. Além disso, a obtenção do extrato bruto ativo foi otimizado a fim de encontrar os requisitos físicos e nutricionais ideais para alcançar um maior rendimento do produto metabólico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POTENCIALMENTE PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

2.1.1 Isolados de actinobactérias

Os 79 isolados (Tabela 1 – Apêndice) de actinobactérias dos gêneros *Streptomyces* e *Nocardia* originados do trabalho de Porsani (2007) a partir de isolamento de sedimentos da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil estão depositados no banco biológico do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro), do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná.

2.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os isolados de actinobactérias que causaram as maiores inibições das bactérias patogênicas (PORSANI *et al.*, 2013) foram identificados ao nível de gênero por meio de características macro e micromorfológicas. A Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. Lâminas retiradas do microcultivo com sete dias de crescimento foram fragmentadas com o auxílio de uma pinça. A fixação do material foi feita com glutaraldeído

2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 2 h em temperatura ambiente (1:1). Em seguida, foi realizada a lavagem em tampão cacodilato 0,1 M, três vezes de 10 min, a desidratação em álcool 50 %, 70 %, 90 % e 100 % (o último duas vezes), 10 a 20 min cada. O ponto crítico foi obtido por meio de CPD-030 Critical Point Dryer e a metalização em ouro em Balzers Union FL 9496 Balzers (Modelo: SCD030). A observação foi feita ao microscópio eletrônico JSM – 6360LV Scanning Electron Microscope (300 mil X).

2.1.3 Identificações de membros da classe actinobactéria

Os isolados de actinobactérias cujos extratos apresentaram atividade antimicrobiana (PORSANI *et al.*, 2013) foram amplificados com os oligonucleotídeos específicos para família de actinobactérias (QUADRO 2) (MALDONADO *et al.*, 2005). A escolha dos oligonucleotídeos iniciadores baseou-se na ampla diversidade de actinobactérias (MINCER *et al.*, 2002).

Target taxa	Primer	Sequência 5'-3'	Temperatura de anelamento	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>Actinobacteria</i>	S-C-Act-0235-a-S-20 S-C-Act-0878-a-A-19	CGCGGCCTATCAGTTGTG CCGTACTCCCCAGGCGGGG	60 °C	640	N/A
<i>Amycolatopsis</i> spp.	AMY2 ATOP ^b	GGTGTGGGCGACATCCACGTTGT GCTGGTACAGAGGGCTGCGATAC	55 °C	450	Tan (2006)
<i>Micromonosporaceae</i>	M2F A3R	SAGAAGAAGCGCCGCC CCAGCCCCACCTTCGAC	65 °C	1000	Pisano <i>et al.</i> (2002)
<i>Pseudonocardia</i> spp.	AMP2 AMP3	GTGGAAGTTTTTCGGCTGGGG GCGGCACAGAGACCGTGAAT	60 °C	640	Desconhecido
<i>Streptomyces</i> spp.	Sm6F Sm5R	GGTGGCGAAGGCGGA GAACTGAGACCGCTTTTTGA	65 °C	600	Monciardini <i>et al.</i> (2002)
<i>Streptosporangiaceae</i>	21F 959R	GACGAARNTGACGTGTA CGTTGCGTCTAATTAAGCAA	58 °C	500	Hayakawa and Nonomura 1987
<i>Thermomonosporaceae</i>	T3F T8R	GGGAGAATGGAATTCCC CCCCACCTTCGACC	59 °C	800	Athalye <i>et al.</i> (1985)
Universal ^a	27f 152S ^b	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG AAGGAGCTCWTCCARCC	55 °C	1500	N/A

QUADRO 2- OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MEMBROS DA CLASSE ACTINOBACTÉRIA

Fonte: Maldonado *et al.*, 2005

N/A, Não aplicável.

^aEstes oligonucleotídeos são universais e não são específicos para ordem *Actinomycetales*.

^bSequências complementares estão mostradas pelo oligonucleotídeo reverso.

A amplificação para a amostra de actinobactérias seguiu as condições descritas por Monciardini *et al.* (2002) contendo: 50 ng de DNA extraído, tampão da reação 1 X, 1,5 U de *Taq* polimerase, 0,5 μ M de *primers* (25 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ em um volume final de 50 μ L. A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*® modelo *Mastercycler Gradient* com desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 45 seg a 94 °C, 45 seg a 65 °C e 1 min a 72 °C, e extensão final de 10 min a 72 °C.

Os produtos de amplificação foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1 % (p/v em TBE 1x utilizando o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (1000 pb *Ludwing Biotec*).

Para a purificação dos produtos de PCR foram acrescidos 50 μ L de PEG (PEG 20 %, NaCl 2,5 M) e incubados a 37 °C por 30 min. Após este período os tubos foram centrifugados por 20 min a 13800 g. Então, o sobrenadante foi descartado e ao restante foi adicionado 125 μ L de etanol 80 % gelado permanecendo em contato por 1 min antes de nova centrifugação a 13800 g por 2 min. Após, o sobrenadante foi descartado e ao restante foi adicionado 125 μ L de etanol absoluto pela parede do tubo. Novamente o sobrenadante foi descartado e o restante do etanol evaporado resultando em um *pellet*, que foi ressuspendido em 15 μ L de água ultrapura permanecendo em repouso a temperatura ambiente por 24 h. Após a purificação, os produtos foram quantificados em gel de agarose 1 % (p/v em TBE 1x) utilizando o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (1000 pb *Ludwing Biotec*).

2.1.4 Sequenciamento da região 16S do rDNA

Os isolados que produziram extratos com atividade antimicrobiana foram sequenciados com os oligonucleotídeos específicos para rDNA 16S de actinobactérias para identificação ao nível de espécie. O sequenciamento das regiões de rDNA foi realizado pelo método de terminação da cadeia (SANGER, NICKLEN, COULSON, 1977) utilizando a incorporação de dideoxinucleotídeos fluorescentes em Sequenciador Automático de DNA. Foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com os primers 9F(5' GAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e Sm5R (5' GAACTGAGACCGGCTTTTGA3').

As reações de sequenciamento foram realizadas em placas envolvidas em papel alumínio com pouca luz incidente. Para cada reação foram utilizados 10 ng do produto de PCR, sendo o

volume a ser utilizado calculado de acordo com a quantificação realizada após a purificação do DNA amplificado.

Para a purificação da reação de sequenciamento a cada produto da reação anterior, foi adicionado 1 µL de acetato de amônio 7,5 M e 27,5 µL de etanol absoluto. Em seguida, a placa de sequenciamento foi fechada e o conteúdo homogeneizado por inversão por 30 vezes. A placa foi centrifugada por 45 min a 2500 g e o sobrenadante descartado. Após um *spin down* a 500 g (placa invertida sobre um papel toalha) foi adicionado 100 µL de etanol 70 % recém-preparado. Seguiu-se uma centrifugação a 2500 g com a placa aberta, e o sobrenadante foi descartado novamente e um *spin down* a 750 g foi aplicado. Após, a placa foi submetida à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo ABI 3130.

A edição das sequências obtidas foi realizada com o auxílio do pacote do programa Staden versão 1.6 (BONFIELD *et al.*, 2002). As sequências obtidas foram alinhadas pelo programa MEGA versão 5.0 (TAMURA *et al.*, 2006) e foram comparadas com outras sequências existentes no banco de dados NCBI pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997), permitindo a detecção de similaridade de uma sequência biológica com sequências caracterizadas já existentes. Para a análise das sequências obtidas neste trabalho foi utilizado o programa BLASTn que compara sequências de nucleotídeos com um banco de dados.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

2.2.1 Obtenção de metabólitos secundários em meio líquido

Para o cultivo em meio líquido, o isolado selecionado *Streptomyces longwoodensis* (PORSANI *et al.*, 2013) foi inoculado em placa de Petri contendo meio sólido Czapeck Dox. Após o crescimento por 7 a 14 dias a 28 °C, foram inoculadas 3×10^8 UFC/mL em 50 mL de meio líquido contendo a concentração de 40 g/L de glicose e 10 g/L de peptona e incubados sob agitação a 150 rpm a 28 °C por 7 dias para a análise em escala analítica.

Após este período, foram transferidos para frascos Erlenmeyers contendo 150 mL de meio líquido, sendo cultivados por mais 7 dias sob as mesmas condições da escala analítica (SOUZA *et al.*, 2004).

2.2.2 Obtenção do extrato bruto

Após o período de incubação em escala preparativa, o caldo de fermentação (item 2.2.1) foi filtrado a vácuo com papel filtro em funil de Büchner. Ao volume do filtrado obtido foram adicionados 200 mL de acetato de etila (AcOEt), agitando-se vigorosamente a solução para a formação de duas fases: uma aquosa, na parte inferior, e outra orgânica, na parte superior. A fase orgânica foi separada em um novo recipiente e a aquosa foi submetida a mais três extrações com 100 mL de AcOEt. A fase orgânica foi evaporada à secura em rotavapor para o cálculo do rendimento. A fração AcOEt foi submetida à técnicas cromatográficas diversas, utilizando-se solventes de polaridade adequada para o isolamento das substâncias de interesse (BARATTO, 2010 adaptado por PORSANI-AZUMA, 2011).

2.2.3 Isolamento e elucidação estrutural dos compostos bioativos

O extrato bruto de coloração alaranjada (650 mg) obtido foi fracionado por cromatografia em coluna e cromatografia centrífuga circular (Chromatotron®), usando rotores de sílica. A eluição com acetato de etila: hexano (4:1) resultou no isolamento das actinomicinas X0β (17 mg), X₂ (115 mg) e D (24 mg). Os metabólitos foram estruturalmente caracterizados por meio de técnicas espectroscópicas (IV, EM, RMN) e comparação com dados da literatura (LACKNER *et al.*, 2000).

A cromatografia preparativa em coluna foi realizada em gel de sílica (40-63 µm), Merck. Cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada com placas de sílica Fluka. Cromatografia centrífuga em camada delgada foi realizada em Chromatotron modelo 7924T (Harrison Research, Palo Alto, CA, EUA) utilizando rotores de sílica. Os dados de RMN foram adquiridos com instrumentos Bruker (Rheinstetten, Alemanha), modelos Advance DRX 400 e DPX 200, utilizando TMS como padrão interno. Dados de EM foram obtidos com um aparelho Thermo Fisher Scientific Inc. (LTQ XL Linear Ion Armadilha) no Departamento de Química da UFPR.

2.2.4 CLAE - Método analítico para quantificar a produção de substâncias antimicrobianas

As actinomicinas isoladas a partir dos extratos obtidos do metabolismo secundário da actinobactéria isolada da região entre-marés *S. longwoodensis* (item 2.2.1), foram quantificados e analisados por CLAE no Departamento de Química da UFPR (SILVA, 2002; MAIA, 2009). Uma alíquota do caldo de fermentação (200 µl) foi transferida para um microtubo. Em seguida, acetonitrila (400 µl) foi adicionado, o tubo foi agitado durante 30 seg num agitador de vórtice, e depois centrifugou-se durante 2 min. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi extraído novamente com a mesma quantidade de solvente. Os extratos combinados foram em seguida analisados por CLAE. Uma curva analítica foi preparada com soluções de actinomicinas purificadas em MeOH (1000, 500, 250, 124 e 62,5 ng/mL).

As análises foram realizadas em sistema Varian (Palo Alto, Califórnia) que consistia de bomba (modelo ProStar 230), um detector de arranjo de diodos (ProStar 335) e amostrador automático (modelo ProStar 400). As amostras (20 µl) foram injetadas numa coluna Eclipse XDB-C18, 4,6 X 150 mm, 5 mm (Agilent). A eluição foi realizada com MeOH/H₂O (7:3), e foram monitorizadas a 445 nm.

2.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para avaliar os efeitos provenientes da interação entre as substâncias de interesse (extrato bruto e actinomicina X₂) e uma linhagem celular, células Vero (linhagem celular isolada a partir de tecido epitelial de rim de macaco) foram cultivadas em microplacas de 96 poços. As monocamadas foram incubadas durante 96 h a 37 °C e 5 % de CO₂ com meio DMEM contendo 5 % de soro fetal bovino (FBS), penicilina G (100 UI/mL), enrofloxacina (10 µg/mL) e anfotericina B (1,25 µg/mL), em duas séries de diluições dos compostos a diferentes concentrações, variando de 0,98-500 µg/mL e 1 % de DMSO (DENIZOT, LANG, 1986).

Para isso, foram utilizadas três repetições de oito poços para a avaliação da toxicidade *in vitro* das amostras de extrato bruto e a actinomicina X₂ (item 2.2.3) de cada diluição. As amostras foram esterilizadas por filtração através de membranas de PVDF (tamanho do poro 0,22 µm), foi

determinada de acordo com Denizot e Lang (1986), através da quantificação das células viáveis utilizando brometo 3 - (4,5 - dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazol (MTT- 5,0 mg/mL). O MTT é um sal de tetrazólio amarelo que é convertido em formazan púrpura por desidrogenases mitocondriais das células vivas. Assim, a quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células vivas. E é possível calcular a CC₅₀, definida como a concentração da amostra que poderia reduzir em 50 % o número de células viáveis, quando comparado com um controle.

Este experimento foi expresso estatisticamente como a média \pm desvio padrão, e analisados pelo teste *t Student* com $P < 0,002$. Variáveis que excederam o limite de quantificação foram consideradas estatisticamente significativas (BOLTON, 1990).

2.4 MÉTODO DA MACRODILUIÇÃO (ADAPTAÇÃO DO MANUAL PADRONIZADO PELA CLSI M7-A6, 2003; *GOLD STANDARD* PARA A VERIFICAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA)

2.4.1 Micro-organismos patogênicos utilizados

Para os testes de atividade antimicrobiana, foram escolhidos micro-organismos considerados agentes causadores de doenças em humanos. As seguintes linhagens patogênicas de referência foram utilizadas: a levedura *Candida albicans* ATCC 10231 e as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* resistente (MRSA - linhagem selvagem, Hospital Universitário de Curitiba, PR).

2.4.2 Método da Macrodiluição

Em tubo de ensaio contendo 1mL de caldo Müller-Hinton (CMH), já adicionado o extrato bruto ou actinomicina X₂ (item 2.2.3) em concentração conhecida, foi inoculado 1mL do micro-organismo a ser combatido na concentração de 10⁵ UFC/mL, proveniente de uma cultura prévia

em AMH de 24 h (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e MRSA). A concentração do micro-organismo foi ajustada com o auxílio de uma escala MacFarland 0,5 seguida de diluição. Um controle de crescimento do inóculo foi preparado contendo 1mL de CMH e 1mL do micro-organismo na mesma concentração do ensaio. Para controlar a influência do solvente (DMSO) na atividade do extrato e da actinomicina X₂ foram preparados controles contendo o volume de solvente igual ao volume usado nas amostras de extrato e actinomicina X₂. Para a confirmação dos resultados foram semeados com o auxílio de um *Swab* os tubos que apresentaram a concentração inibitória, em placa de Petri contendo AMH e esta foi incubada a 35 °C por 24 h para posterior análise do crescimento dos micro-organismos. Para a levedura o período de incubação foi de 48 h, também a 35 °C. O teste foi realizado em duplicata. Foram realizadas variações de 10, 50, 100, 250 e 500 µg/mL do extrato bruto e as concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL de actinomicina X₂ para que fosse encontrada a concentração inibitória mínima. Como controles positivos foram utilizados 40 µL de gentamicina e vancomicina (2,0 mg/mL) para as bactérias e 40 µL de nistatina (1000 UI/mL) para levedura.

2.5 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PELO ISOLADO PRODUTOR DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

Para definir os requisitos ideais de cultura em meio líquido para a produção de metabólitos para cada micro-organismo é necessário que se conheça os melhores parâmetros físicos e químicos, assim como, as fontes nutricionais. As fontes de carbono e nitrogênio investigadas neste trabalho foram: sacarose (20 g/L e 40 g/L), dextrose (20 g/L e 40 g/L), maltose (20 g/L e 40 g/L), amido (20 g/L e 40 g/L), nitrato de amônio (6 g/L e 10 g/L), extrato de levedura (6 g/L e 10 g/L) e extrato de malte (6 g/L e 10 g/L). Os parâmetros físico-químicos foram: temperatura, pH e período de crescimento. Os teste foram realizados em triplicata (YU, 2008; NANJWADE, 2010).

2.5.1 Planejamento experimental para três variáveis independentes

O delineamento composto central (DCC) foi utilizado para avaliar se os fatores temperatura, tempo e pH afetavam a produção de biomassa e rendimento da substância bioativa (TABELA 1). O software utilizado para o delineamento do experimento foi Minitab 16 (Minitab Corporation, 2010).

A análise foi realizada baseando-se em três parâmetros: temperatura, pH e tempo de cultivo. Dessa forma, foi realizado um fatorial completo 2^3 , incluindo os 6 pontos axiais e 6 repetições no ponto central, totalizando 20 ensaios (Apêndice – OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOLOGICAMENTE ATIVAS) (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

TABELA 1: VALORES UTILIZADOS NO DCC PARA TRÊS FATORES: pH, TEMPERATURA E TEMPO DE CULTIVO

Variáveis ^a		$-\alpha$	-1	0	1	α
pH	x1	3,32	4	5	6	6,68
Temperatura (°C)	x2	13,2	20	30	40	46,8
Tempo (dias)	x3	1,28	4	8	12	14,72

^a Pontos do delineamento: centro (0), cubo (-1, 1), axial ($-\alpha$, α).
(n=5 no ponto central; $\alpha=1.68179$).

Fonte: O autor

3 RESULTADOS

3.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POTENCIALMENTE PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

O gênero *Streptomyces* caracteriza-se por bactérias Gram positivas, formadoras de micélio. Na figura 3 podem-se observar longas hifas com filamentos que podem ser retos a ondulados. Os filamentos podem sofrer ramificações que se fragmentam em formas bacilares e esféricas e são

capazes de formar um novo organismo (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2004; VENTURA *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2009).

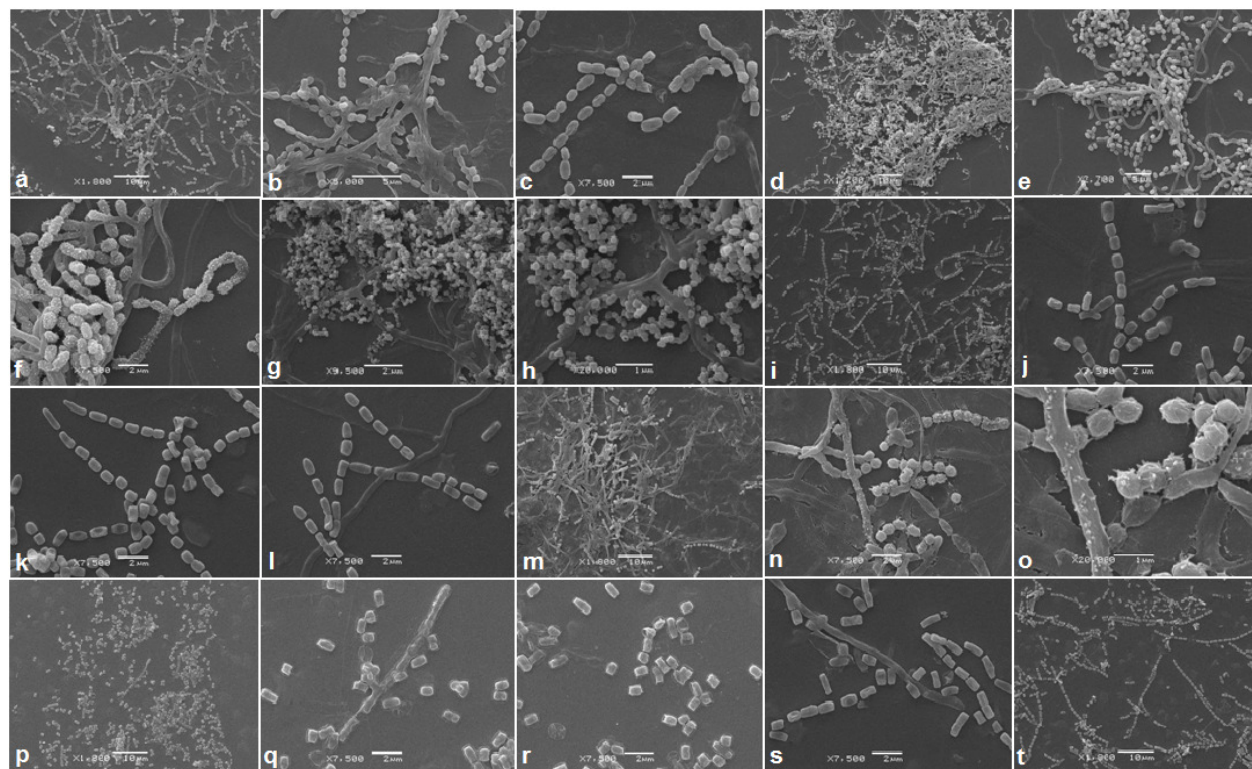


FIGURA 3: MICROMORFOLOGIAS DE ACTINOBACTÉRIAS VISUALIZADAS EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. a, b, c. *Streptomyces parvus* (aumento a: 1000X, b: 5000X, c: 7500X); d, e, f. *Streptomyces variabilis* (aumento d: 1200X, e: 2700X, f: 7500X); g, h. *Streptomyces seoulensis* (aumento g: 9500X, h: 20000); i, j, k, l. *Streptomyces bacillaris* (aumento i: 1800X, j: 7500X, k: 7500X, l: 7500X); m, n, o. *Streptomyces malachitospinus* (aumento m: 1000X, n: 7500X, o: 20000X); p, q, r. *Streptomyces cavourensis* (aumento p: 1000X, q: 7500X, r: 7500X); s, t. *Streptomyces longwoodensis* (aumento s: 7500X e t: 1000X).

Fonte: O autor

O sequenciamento da região 16S do DNA ribossomal dos isolados de actinobactérias produziram sequências acima de 1000 pb. As espécies identificadas foram *Streptomyces parvus*, *S. bacillaris*, *S. cavourensis*, *S. seoulensis*, *S. longwoodensis*, *S. variabilis* e *S. malachitospinus*. As sequências foram alinhadas e submetidas ao Genbank, após a comparação entre sequências já existentes na base de dados que mostraram similaridade variando de 100 a 97 %. Cada isolado de actinobactéria sequenciado ao ser depositado no GenBank recebeu um número de acesso (TABELA 2).

TABELA 2: IDENTIFICAÇÃO POR CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E POR COMPARAÇÃO COM SEQUÊNCIAS 16S DE rDNA DE ACTINOBACTÉRIAS

Isolado	Nº Acesso GenBank	Identificação morfológica	Actinobactérias relacionadas	Acesso	% Identidade
AD G27 12B 83	JX997139	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces parvus</i> <i>Streptomyces parvus</i>	EU741180.1 EU741140	99 99
AS G31 5A 43	JX997140	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces bacillaris</i> <i>Streptomyces bacillaris</i>	FJ792250.1 FJ792580.1	100 99
AD G32 11A 60	JX997141	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces seoulensis</i> <i>Streptomyces seoulensis</i>	EU841610 FJ486370.1	99 98
AS G34 3B 18	JX997143	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces variabilis</i>	JN180216.1	100
AD 7A 41	JX997144	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces variabilis</i> <i>Streptomyces variabilis</i> <i>Streptomyces variabilis</i> <i>Streptomyces variabilis</i> <i>Streptomyces variabilis</i>	EU593728.1 EU570412.1 EU570367.1 EU370085.1	100 100 100 100
AS G35 3A 43	JX997146	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces cavourensis</i>	NR_043851.1	100
AD 11B 76	JX997147	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces cavourensis</i>	AB184264.1	100
AS 3A 26	JX997148	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces cavourensis</i>	HQ610450	100
AD 3B 17	JX997145	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces longwoodensis</i> <i>Streptomyces longwoodensis</i> <i>Streptomyces longwoodensis</i>	EU240414.1 EU841590.1 NR_041161.1	97 97 98
AD G34 12B 82	JX997142	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces malachitospinus</i>	NR041423.1	99

A árvore baseada no sequenciamento do rDNA 16S foi construída por máxima verossimilhança através da aplicação do modelo de distância Tamura 3-parâmetros implementado pelo programa Mega 5.0 com 10.000 inferências de *bootstrap*. De acordo com a Figura 4, sete grandes grupos foram obtidos com valores elevados de *booststraps*.

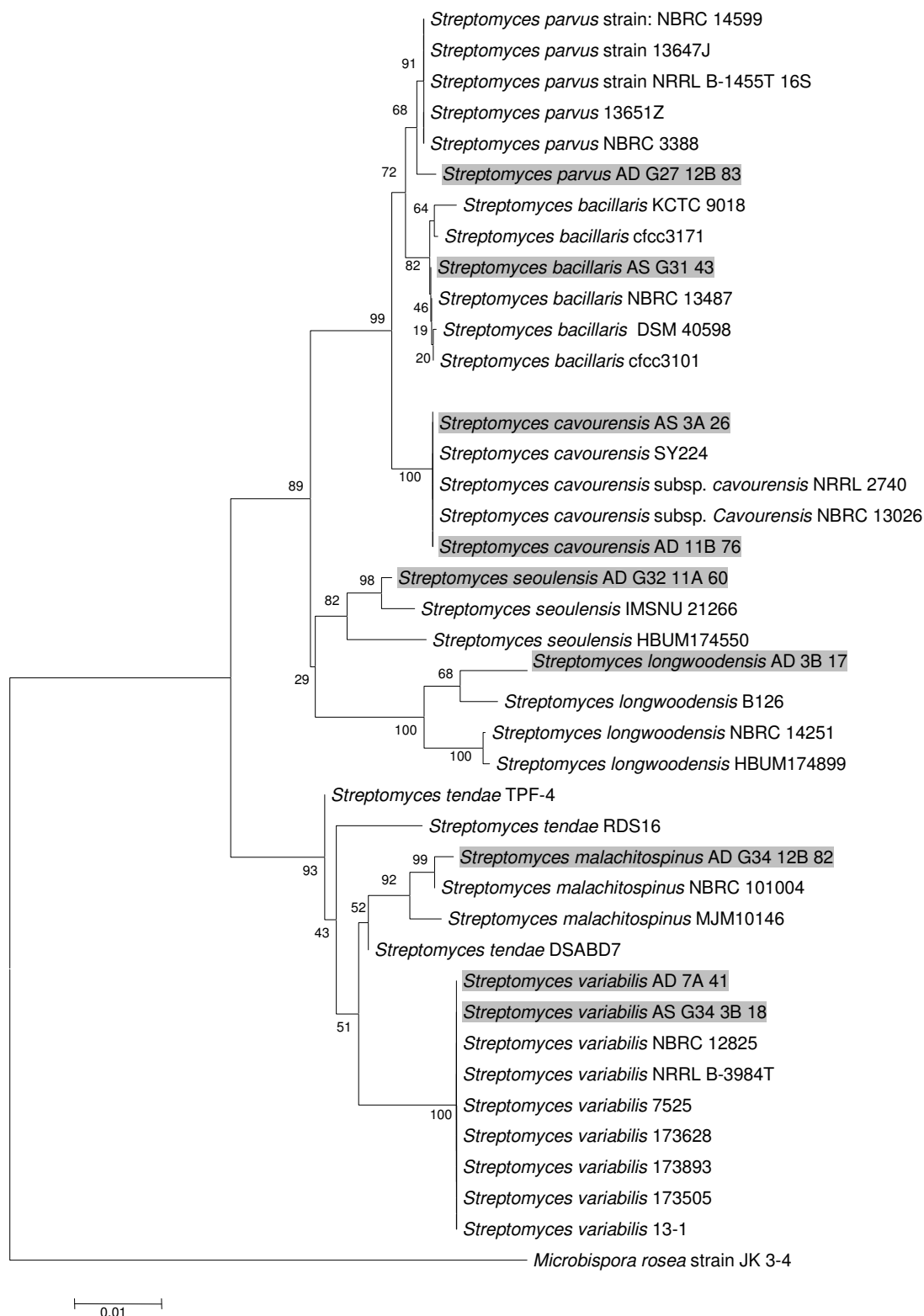


FIGURA 4: ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS LINHAGENS DE *Streptomyces* sp. ISOLADAS E DE LINHAGENS PRÓXIMAS DEPOSITADAS NO *GenBank*. NÚMEROS DOS NÓS INDICAM NÍVEIS DE SUPORTE DE BOOTSTRAP COM BASE NUMA ANÁLISE DE NEIGHBOR-JOINING. *Microbispora rosea* FOI ESCOLHIDO COMO O GRUPO EXTERNO. Fonte: O autor

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

Após isolamento e purificação por métodos cromatográficos, os compostos foram submetidos a análises espectroscópicas. Os dados de RMN permitiram concluir que as substâncias com ação antimicrobiana isolada de *S. longwoodensis* pertencem à classe das actinomicinas do complexo Z (FIGURA 5), por meio de comparação com dados da literatura (LACKNER *et al.*, 2000).

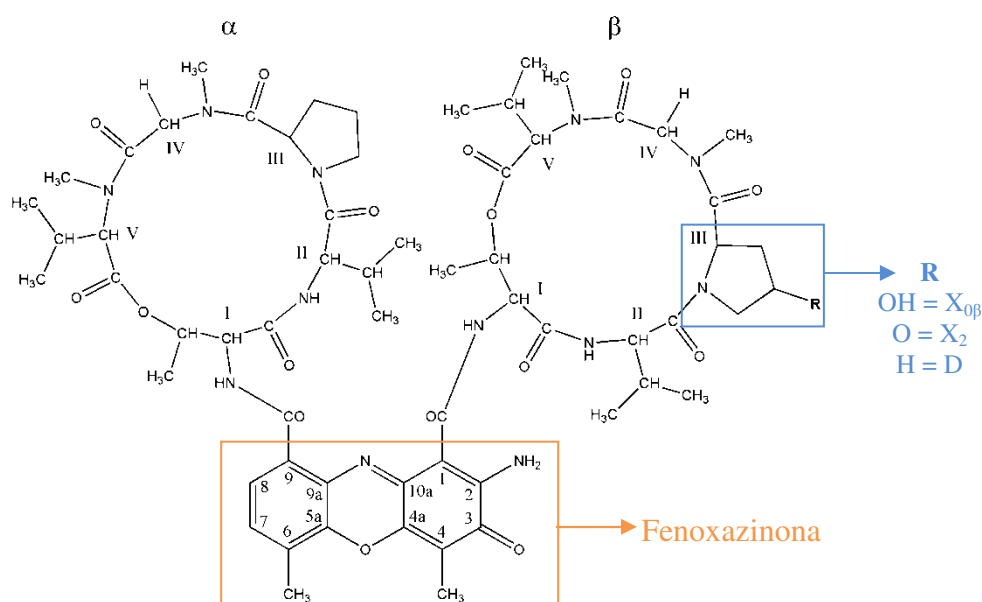


FIGURA 5: ESTRUTURA DA ACTINOMICINA ($R = OH, X_{0\beta}$; $R = O, X_2$; $R = H, D$).

O extrato alaranjado de *S. longwoodensis* continha três componentes principais (FIGURA 6).

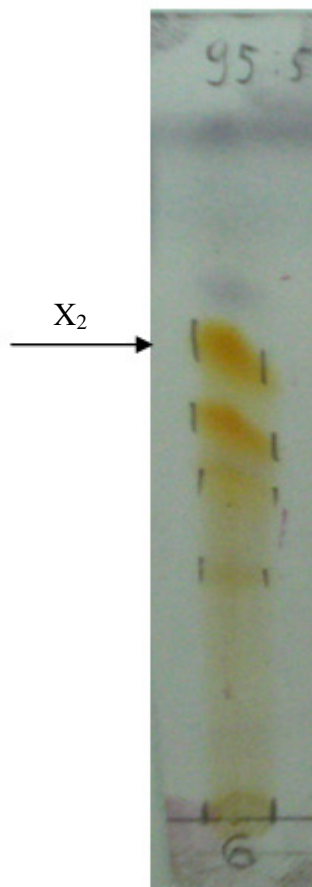


FIGURA 6: PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO DA ACTINOBACTÉRIA *S. longwoodensis* FASE MÓVEL CHCl_3 : MeOH (95:5 V/V) REVELAÇÃO: VANILINA SULFÚRICA.

Fonte: O autor (2010)

O composto isolado X_2 produziu um espectro de UV com uma forte banda de absorção a 440 nm (FIGURA 7). Os espectros de ESI-MS mostraram picos a 1269,6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e 1291,6 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, que são compatíveis com uma fórmula molecular $\text{C}_{62}\text{H}_{86}\text{N}_{12}\text{O}_{17}$. Os espectros de RMN de ^{13}C mostraram sinais que correspondem a uma porção característica das actinomicinas, fenoxazinona, a qual confere cor amarelo-alaranjada aos compostos. Os outros sinais puderam ser atribuídos a anéis α e β que foram comparáveis aos da literatura para actinomicina X_2 (LIFFERTH *et al.*, 1999). Os dados espectroscópicos para os outros dois compostos foram semelhantes aos do primeiro, actinomicina X_2 . A diferença mais importante foi observada no espectro de RMN de ^{13}C e C^4 do resíduo prolina em anel β , em actinomicina X_2 , uma carbonila (209,0 ppm). No segundo composto (D) a ressonância correspondente foi de 22,9 ppm (CH_2 , DEPT), típico de um carbono saturado, enquanto que para o terceiro composto ($\text{X}_{0\beta}$) que foi de 70,6 (CH, DEPT), indicativo de um carbinol. Por conseguinte, o segundo e terceiro compostos isolados D e actinomicina $\text{X}_{0\beta}$,

respectivamente. Os dados espectroscópicos estão de acordo com aqueles descritos na literatura (LIFFERTH *et al.*, 1999).

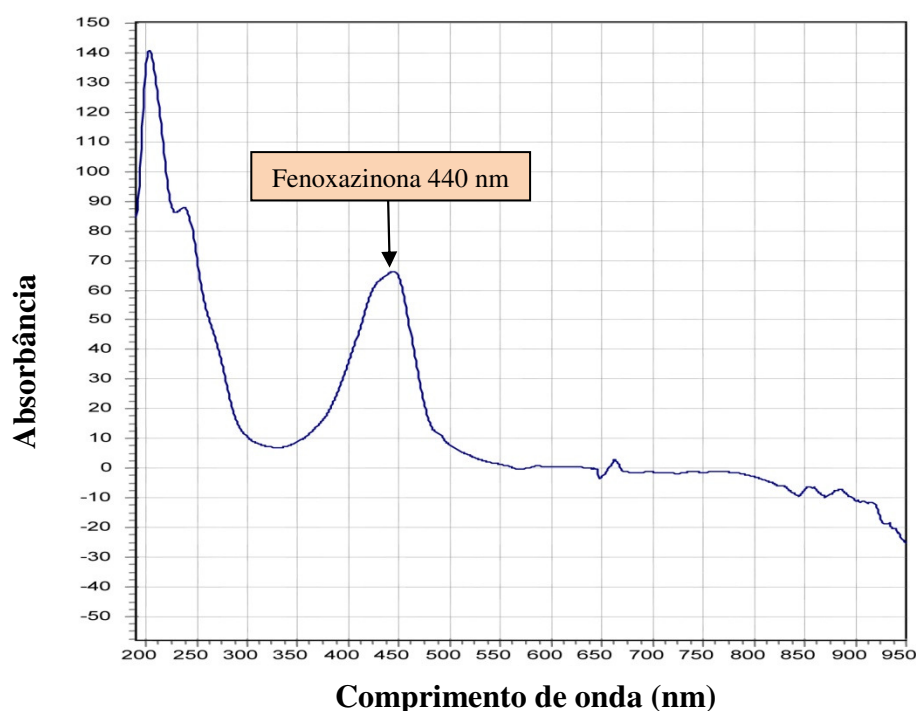


FIGURA 7: ESPECTRO UV DA ACTINOMICINA X₂

Com o intuito de analisar o extrato bruto, frações e substâncias isoladas por CLAE, foi necessário desenvolver um método e para isso otimizar a fase móvel. A mistura de MeOH/H₂O (7:3) deu origem a uma separação da linha de base em menos de 15 min (FIGURA 8). Para análises quantitativas da amostra foi necessária, após a centrifugação da amostra seguida por injeção de sobrenadante, a extração adicional do pelete com o solvente orgânico, porque os metabólitos coloridos foram retidos pela biomassa.

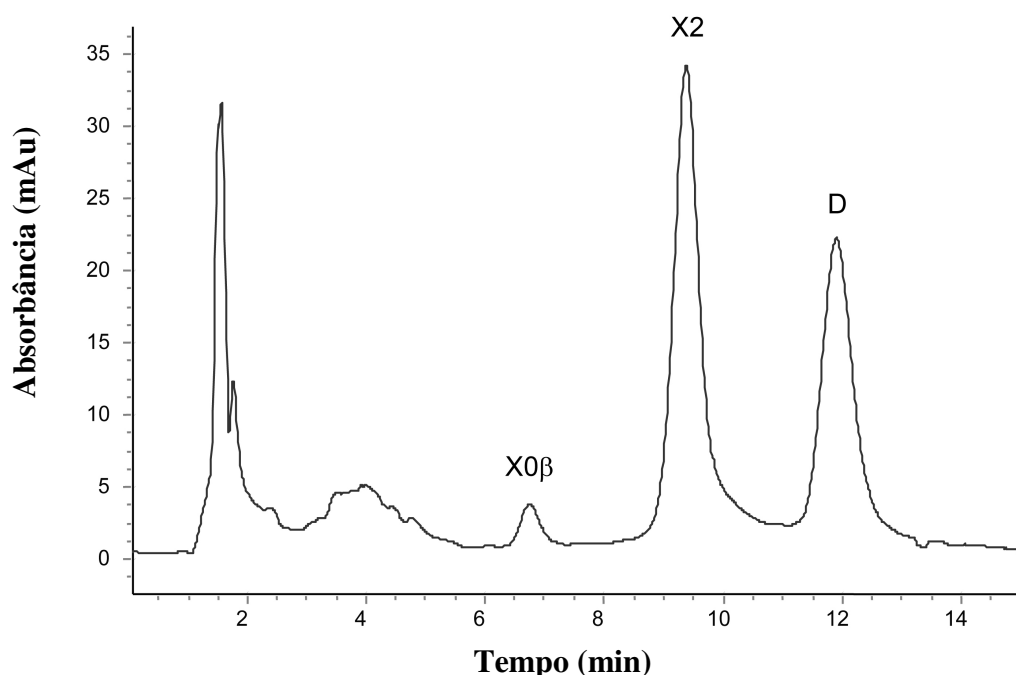


FIGURA 8: CROMATOGRAMA OBTIDO DA ANÁLISE POR CLAE DO EXTRATO BRUTO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE *S. longwoodensis*.

3.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A amostra de extrato bruto mostrou diferença significativa em relação ao controle até a concentração mais baixa testada de 0,98 $\mu\text{g/mL}$ em células Vero para 96 h de incubação, apresentando uma $\text{CC}_{50} < 0,98 \mu\text{g/mL}$ (inferior 90,3 % de células viáveis) (FIGURA 9). Em toda a gama de concentrações que foram avaliadas, houve uma alteração na morfologia normal das células, caracterizado por arredondamento celular e granulação (apoptose). Amostra actinomicina X_2 , também, apresentou o mesmo tipo de efeito citopático, com as células menos viáveis do que o controle a partir de 0,98 $\mu\text{g/mL}$. Nesta concentração, houve uma perda da viabilidade de células Vero de 87,5 %, mostrando igualmente um $\text{CC}_{50} < 0,98 \mu\text{g/mL}$ (FIGURA 10). Interessante notar que, embora as taxas de viabilidade celular tenham sido semelhantes, o extrato bruto foi levemente mais citotóxico. Provavelmente por causa da associação das 3 actinomicinas produzindo o efeito sinérgico que ocorre quando o conjunto de moléculas é mais potente que a substância isolada.

Diante dos resultados obtidos neste ensaio preliminar é necessária a confirmação do efeito citotóxico em outras linhagens celulares.

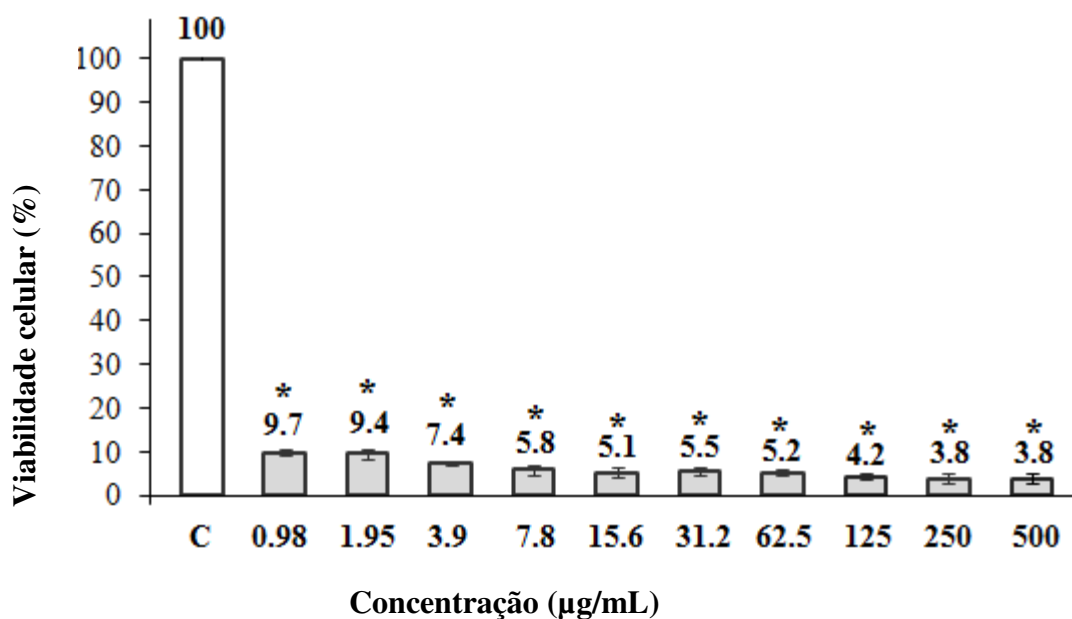


FIGURA 9: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO EM CÉLULAS VERO APÓS 96 h DE INCUBAÇÃO À 37 °C E 5 % DE CO₂ PELO ENSAIO MTT. Controle: amostra sem tratamento. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam os desvios padrão, n=3, * P<0,02.

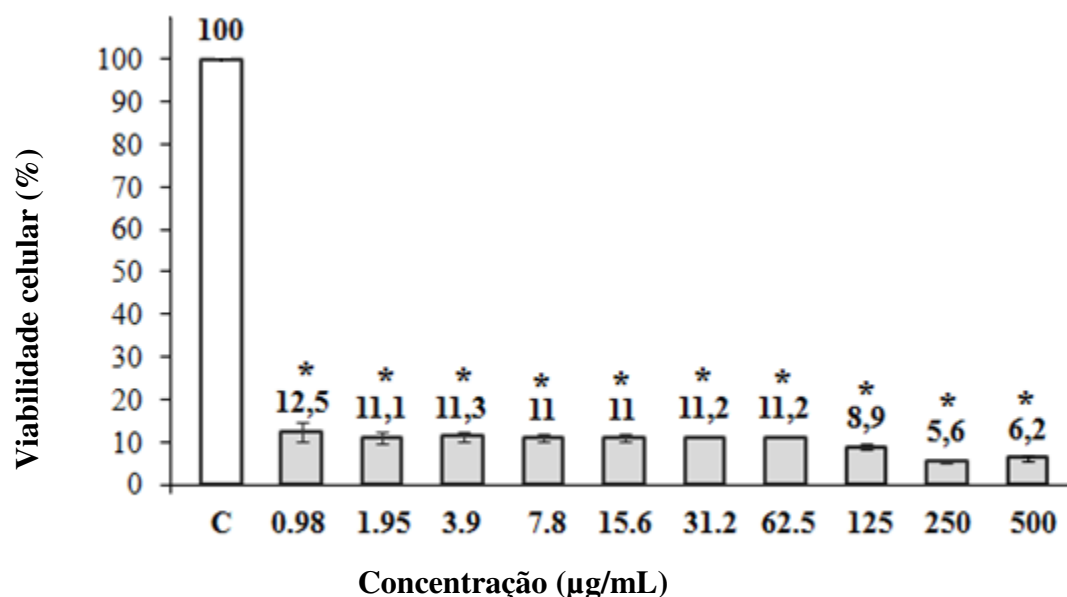


FIGURA 10: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE ACTINOMICINA X₂ EM CÉLULAS VERO APÓS 96 h DE INCUBAÇÃO À 37 °C E 5 % DE CO₂ PELO ENSAIO MTT. Controle: amostra sem tratamento. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam os desvios padrão, n=3, * P<0,02.

3.4 MÉTODO DA MACRODILUIÇÃO (ADAPTAÇÃO DO MANUAL PADRONIZADO PELA CLSI M7-A6, 2003; *GOLD STANDARD* PARA A VERIFICAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA)

Resultados da macrodiluição indicam que o extrato bruto e actinomicina X₂ do isolado *Streptomyces longwoodensis* possui potente atividade antimicrobiana contra *S.aureus*, MRSA, *E. coli* e *C. albicans* (TABELAS 3 e 4). As concentrações inibitórias mínimas (MIC) observadas para o extrato bruto foram de 50 µg/mL para MRSA, 250 µg/mL para *S. aureus* e 500 µg/mL para *C. albicans*. Em comparação, a actinomicina X₂ teve menor MIC, pois 25 µg/mL inibiram as linhagens *S. aureus*, MRSA e *E. coli*.

TABELA 3: CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC) DO EXTRATO BRUTO DE *S. longwoodensis*

Concentração do extrato (µg/mL)	<i>S.aureus</i>		MRSA	<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>	KPC	<i>C. albicans</i>		Controle +		Controle -	
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
			+			+	+						
50	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
			-			+	+						
100	+/-		-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	+/-		-			+	+						
250	-	-	-	+	+	+	+	+/-		+	+	-	-
			-			+	+	+/-					
500	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
			-			+	+						

Legenda: Ocorreu turvação e houve crescimento em placa: + (não se obteve atividade); não ocorreu turvação e não ocorreu crescimento em placa: - (obteve-se atividade bactericida ou fungicida); ocorreu pouco crescimento em placa em relação ao controle: +/- (atividade bacteriostática ou fungistática). Controle para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E.coli*: gentamicina (2 mg/mL); controle para *C. albicans*: nistatina (1000 UI/mL); controle para MRSA: vancomicina (2 mg/mL).

Fonte: O autor

TABELA 4: CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC) DE ACTINOMICINA X₂ DE *S. longwoodensis*

Concentração do extrato (µg/mL)	<i>S.aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	Controle +	Controle -
12,5	+	+	+	+	+	-
25	-	-	-	+	+	-
50	-	-	-	+	+	-
100	-	-	-	+	+	-
200	-	-	-	+	+	-

Legenda: Ocorreu turvação e houve crescimento em placa: + (não se obteve atividade); não ocorreu turvação e não ocorreu crescimento em placa: - (obteve-se atividade bactericida ou fungicida). Controle para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E.coli*: gentamicina (2 mg/mL); controle para *C. albicans*: nistatina (1000 UI/mL); controle para MRSA: vancomicina (2 mg/mL).

Fonte: O autor

3.5 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PELO ISOLADO PRODUTOR DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

Em estudo usando DCC foi possível definir quais são as faixas mais adequadas para cada resposta desejada (temperatura, pH e tempo de cultivo). Dessa forma, as melhores condições encontradas para a otimização da produção de biomassa (g) foram a temperatura de 30 °C; o tempo de cultivo 7,5 dias e o pH 5,2 (FIGURA 11). Cultivando o micro-organismo nestas condições, foi possível obter um rendimento de 3,2 g/L

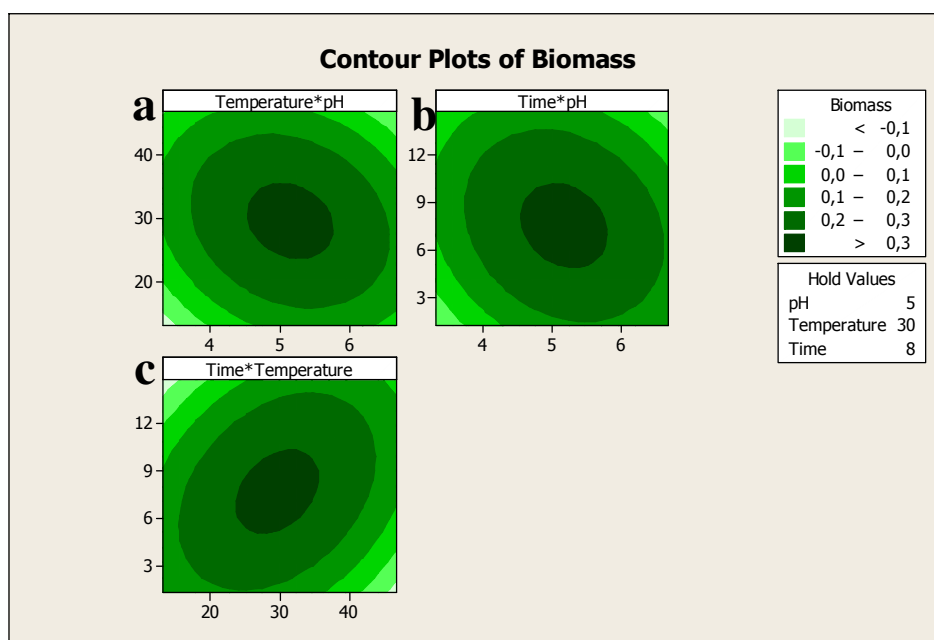


FIGURA 11: MAPA DE CONTORNO EM FUNÇÃO DO pH, TEMPERATURA E TEMPO DE CULTIVO DE *S. longwoodensis*

Legenda: Gráfico a: temperatura x pH (30 °C e 5, temperatura e pH ótimos, respectivamente). Gráfico b: tempo x pH (8 dias e 5, tempo de cultivo e pH ótimos, respectivamente). Gráfico c: tempo x temperatura (8 dias e 30 °C, tempo e temperatura ótimos, respectivamente).

Os melhores rendimentos foram obtidos quando se usou amido e dextrose como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio (TABELA 5).

TABELA 5: FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO E RESPOSTA DA BIOMASSA (g) DE *S. longwoodensis*

Ensaio Fonte de Carbono e Nitrogênio			
Ensaio	Fonte de C e N	Biomassa (g)	Média
1	Sacarose 20 g/L	0,097	0,103
2		0,109	
3	Sacarose 40 g/L	0,109	0,136
4		0,163	
5	Dextrose 20 g/L	0,143	0,150
6		0,158	
7	Dextrose 40 g/L	0,353	0,344
8		0,336	
9	Maltose 20 g/L	0,042	0,088
10		0,135	
11	Maltose 40 g/L	0,138	0,152
12		0,166	
13	Amido 20 g/L	0,134	0,134
14		0,134	
15	Amido 40 g/L	0,489	0,434
16		0,380	
17	Nitrato de amônio 6 g/L	0,070	0,071
18		0,072	
19	Nitrato de amônio 10 g/L	0,096	0,088
20		0,081	
21	Extrato de levedura 6 g/L	0,457	0,252
22		0,0476	
23	Extrato de levedura 10 g/L	0,558	0,450
24		0,342	
25	Extrato de malte 6 g/L	0,148	0,155
26		0,163	
27	Extrato de malte 10 g/L	0,195	0,213
28		0,232	

Fonte: O autor

A maior produção de metabólitos obtida foi com dextrose (40 g/L) e peptona (10 g/L) a um pH de 5,5, temperatura 30 °C, após 7 dias. Nestas condições, os rendimentos de actinomicinas X₂, D e X0β foram 1184, 1482 e 149 mg/L, respectivamente (FIGURA12).

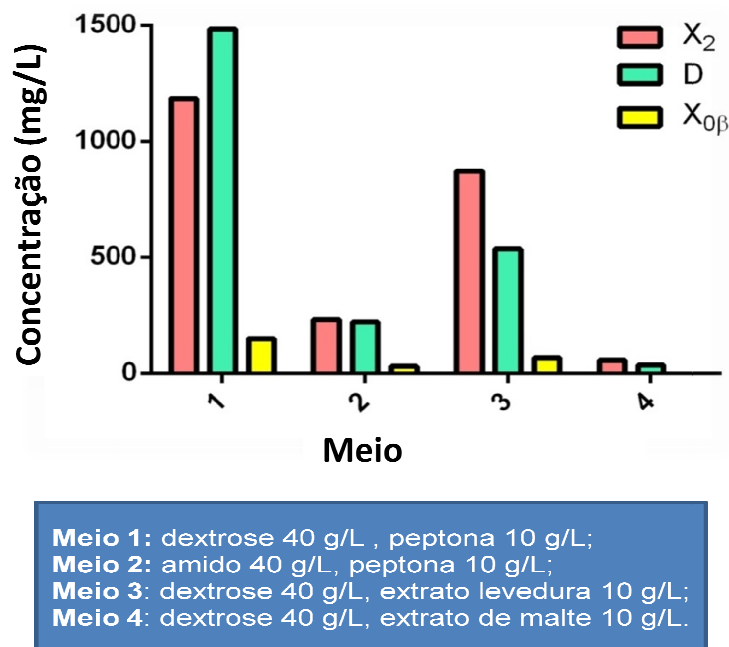


FIGURA 12: INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO NA PRODUÇÃO DE ACTINOMICINAS X₂, D E X_{0β} POR *S. longwoodensis*.

4 DISCUSSÃO

As actinobactérias, isoladas da região entre-marés, potencialmente produtoras de substâncias antimicrobianas foram identificadas como *Streptomyces parvus*, *Streptomyces bacillaris*, *Streptomyces cavourensis*, *Streptomyces seoulensis*, *Streptomyces longwoodensis*, *Streptomyces variabilis* e *Streptomyces malachitospinus*.

No estudo realizado por Maldonado *et al.* (2009), sobre diversidade de actinobactérias isoladas a partir de sedimento marinho, a maioria pertence ao gênero *Streptomyces*, possuindo atividade antimicrobiana contra micro-organismos Gram positivos e negativos. Estas actinobactérias são conhecidas como fontes de metabólitos secundários com grande capacidade para produção de compostos bioativos. Além disso, os micro-organismos pertencentes às famílias Micromonosporaceae, Pseudonocardiaceae, Streptomycetaceae, Streptosporangiaceae, Thermomonosporaceae são conhecidos por produzirem compostos antibióticos incluindo

eritromicina, gentamicina, valinomicina, rifamicina, teicoplanina e vancomicina (MONCIARDINI *et al.* 2002).

A actinobactéria *S. seoulensis* descrita por Chun *et al.* (1997), é aeróbia, Gram positiva, forma micélio amarelo e esporos de cor cinza em ágar glicerol-asparagina. Dentre os metabólitos produzidos por *S. seoulensis* destaca-se a desidrogenase lipoamida (LPD) (YOUN *et al.*, 1998). Esta enzima é um componente essencial do complexo piruvato desidrogenase que desempenham um papel crucial no metabolismo central de organismos aeróbios; LPD é um agente facilitador na ciclagem redox de compostos de quinona e tem sido amplamente estudada, pois muitas drogas antitumorais contêm o núcleo quinona (YOUN *et al.*, 2000).

A espécie *S. parvus* produz compostos arilomicinas os quais são inibidores de peptidase e apresentam potencial antibiótico de amplo espectro tanto para bactérias Gram-positivas como Gram-negativas, tais como *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus epidermidis* (JIN *et al.*, 2012; RAO *et al.*, 2012).

XIN *et al.* (2011) isolaram actinobactérias de esponjas marinhas, dentre estas a espécie *S. bacillaris*, na qual foram rastreados genes que codificam policetídeos sintetases (PKS) com potencial para produção de compostos ativos.

Em pesquisa, *S. cavourensis*, espécie de actinobactéria isolada de plantas medicinais endofíticas, foi capaz de inibir *S. aureus* resistente à penicilina (ZHANG, REN, ZHANG, 2012).

Em esforços contínuos para procurar produtos naturais a partir de bactérias marinhas, obteve-se uma série de frações derivadas da actinobactéria marinha *S. variabilis* que exibiu seletividade para linhagem de células de câncer pancreático. A análise das frações ativas mostrou a presença de amosamida A e B, assim como foi possível, também, o isolamento de ammosamide D (PAN *et al.*, 2012).

Kalakoutskii *et al.* (1990) relatam comunidades de algas e bactérias em culturas mistas, com predominância de actinobactérias em associação com células de algas e com outros organismos. A espécie *S. malachitospinus* estimulou a formação de zigotos no fungo filamentoso *Phycomyces blakesleeanus*.

A espécie *S. longwoodensis* foi descrita por Prosser e Palleroni, (1976), produz o antibiótico ionóforo poliéter, a lisocelina, e caracteriza-se pela cor cinza de seus esporos, que se dispõe em espiral. Geralmente, os ionóforos são altamente efetivos contra bactérias Gram-positivas, mas exibem pouca ou nenhuma atividade sobre bactérias Gram-negativas (BERCHIELLI, 2011). LACKNER *et al.* (2000) identificaram compostos bioativos com ação antimicrobiana de *S. longwoodensis* pertenciam à classe das actinomicinas do complexo Z.

As actinomicinas são uma família de cromopeptídeos com potencial antibiótico e antitumoral isolados a partir de *Streptomyces* sp. Complexos de actinomicina foram denominados A, B, C, D, I, X e Z. As actinomicinas compartilham o mesmo cromóforo fenoxazinona, variando apenas no conteúdo de aminoácidos das duas porções depsipentapeptídeo. Actinomicinas C3 e D possuem aplicações clínicas como drogas anticâncer, particularmente na terapia de tumor de Wilm e sarcoma em crianças e ainda, actinomicina D, foi proposto como um agente terapêutico para a AIDS (Síndrome da imunodeficiência adquirida), pois é um potente inibidor do vírus HIV-1 (MASON; KATZ, 1974; YUNG *et al.*, 1985; LACKNER *et al.*, 2000). Ainda, Chen *et al.* (2012) investigaram a actinobactéria *Streptomyces avermitilis* para produção de actinomicina que apresentou ação inibitória contra *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*. Neste trabalho constatou-se que *S. longwoodensis* é um excelente produtor de actinomicina e pode ser, portanto, uma nova fonte altamente produtiva de actinomicinas X₂, D e X0β.

Para avaliar os efeitos provenientes da interação entre as substâncias de interesse e uma linhagem celular utilizou-se as células Vero (DENIZOT, LANG, 1986). Neste ensaio de citotoxicidade, houve diferenças significativas em relação ao controle (CC₅₀ < 0,98 µg/mL), sem extrato, onde a concentração mais baixa testada apresentou alteração na morfologia normal das células. Diante da elevada toxicidade do extrato bruto e das substâncias isoladas investigou-se a atividade biológica entomopatogênica, tema abordado mais profundamente no Capítulo 3. Muitas espécies de actinobactérias, como as pertencentes ao gênero *Streptomyces*, são conhecidas como agentes de biocontrole. O controle biológico de pragas tem sido frequentemente utilizado em países tropicais, como o Brasil, e é apoiado pelo desenvolvimento de pesquisa básica e aplicada local (LACAVA, AZEVEDO, 2014).

Pan *et al.* (2012) descreveram o metabólito Amosamida D, um composto redutor de quinonas, que impede a formação correta da dupla hélice de DNA no núcleo das células, causando apoptose. Kesavan *et al.* (2014) caracterizaram metabólitos obtidos do extrato de um isolado de *S. variabilis*, citando diversos métodos de ação biológica, como eliminação de células tumorais na medula óssea, atividade citotóxica, estimulação de adipogênese e gliceroneogênese, além de afetar a diferenciação de liposarcoma humano.

Em nossa pesquisa, os metabólitos isolados de *S. longwoodensis* apresentaram potente atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, MRSA, *E. coli* e *C. albicans*. Estas linhagens foram escolhidas para o teste de atividade antimicrobiana por serem consideradas agentes causadores de doenças no homem. *C. albicans* é um patógeno oportunista, são fungos detectados com maior frequência na cavidade oral (O'SULLIVAN *et al.* 2000; GHANNOUM *et al.* 2010) e a candidíase

é a infecção mais comum causada pelo gênero *Candida* (CANNON *et al.* 1995). *S. aureus* é uma das bactérias mais frequentemente identificadas como causadora de infecções nosocomiais, particularmente *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA) (MENDOZA *et al.*, 2000). MRSA é reconhecido como um dos principais agentes virulentos, membro persistente da microbiota endógena humana e relacionado a importantes processos infecciosos (SILVA, 2012). *E. coli* pode ser prejudicial à saúde dependendo da quantidade no organismo, causando sintomas de febre e diarreia em humanos ou em animais (MACDONALD *et al.* 2015; ANON, 2006).

As concentrações inibitórias mínimas (MIC) observadas para o extrato bruto de *S. longwoodensis* foram de 50 µg/mL para MRSA, 250 µg/mL para *S. aureus* e 500 µg/mL para a *C. albicans*. Em comparação, a actinomicina X₂ teve menor MIC, pois, 25 µg/mL inibiram as linhagens *S. aureus*, MRSA e *E. coli*.

O estudo da concentração mínima inibitória é importante por testar a ação bactericida dos compostos e os resultados obtidos poderão ser utilizados no desenvolvimento de produtos antimicrobianos. Neste sentido, Pandey *et al.*, (2008) estimaram a MIC da substância ativa produzida por *Streptomyces* spp. e *Saccharopolyspora* spp. contra *S. aureus* de 5,0 e 1,25 mg/mL, respectivamente. Mukai *et al.* (2006) estudaram a MIC do antibiótico transvalencina Z e estimaram o valor contra bactérias Gram-positivas em menos de 4,0 mg/mL, e contra Gram-negativas de 0,25 mg/mL. O extrato bruto do isolado de *Streptomyces* revelou atividade contra *E. coli* e *S. aureus* e apresentou uma MIC de 10 à 5 mg/mL (SAADOUN; ALAWAWDEH, 2011). Em estudo realizado por Sunaryanto *et al.* (2011), *Streptomyces* sp., isolado de sedimento marinho, apresentou MIC para *S. aureus* de 80,2 mg/mL. Outro antibiótico produzido por *Streptomyces* exibiu atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *C. albicans* de 500 a 600 µg/mL (VIJAYALAKSHMI; SUDHA, 2011). As MICs obtidas neste trabalho foram inferiores as descritas na literatura, o que pode indicar a exploração destes compostos como promissores candidatos ao desenvolvimento de novos produtos antimicrobianos.

Para obter compostos a partir de micro-organismos em quantidade suficientes para realização de testes biológicos é imprescindível elevar o rendimento dos metabólitos (YU *et al.*, 2008). Em Sajid *et al.* (2011), a otimização do processo de produção do metabólito antifúngico isolado da espécie *Streptomyces malachitofuscus* resultou em uma temperatura ótima de 35 °C e pH de 7,8. *Streptomyces spectabilis*, isolado a partir de solo, produziu compostos antimicrobianos ativos contra bactérias Gram-positiva e as melhores fontes nutricionais para o crescimento e produção de antibióticos foram glucose e peptona (HOLKAR *et al.*, 2013).

Dessa forma, a otimização da produção do extrato bruto ativo obtido a partir de *S. longwoodensis* através de meio de cultivo e os requisitos de fermentação permitiram a obtenção de maiores quantidades do produto. A maior produção de metabólitos foi encontrado quando a dextrose (40 g/L) e peptona (10 g/L) foram cultivadas em pH 5,5, temperatura 30 °C, após 7 dias. Nestas condições, os rendimentos de actinomicinas X₂, D e X0β foram 1184, 1482, e 149 mg/L, respectivamente.

Rendimentos da produção de actinomicina variam muito, dependendo das espécies de micro-organismos e das condições utilizadas. Para actinomicina D, a produção pode apresentar baixa concentração (28 mg/L), utilizando *S. padanus* (KUROSAWA *et al.*, 2006) ou elevada (1177 mg/L), utilizando *S. avermitilis* (CHEN *et al.*, 2012). Comparando com os dados da literatura nossos resultados mostram, portanto, que a *S. longwoodensis* apresenta potencial para o desenvolvimento do processo de produção de actinomicinas.

5 CONCLUSÕES

- *S. longwoodensis*, obtido de sedimento marinho da Ilha do Mel, PR, Brasil, produz actinomicinas X₂, D e X0β;
- As condições de fermentação otimizadas levaram a uma alta produção de actinomicinas;
- As actinomicinas possuem potente atividade antimicrobiana contra *S.aureus*, MRSA, *E.coli* e *C. albicans*.

6 REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHAHG, J.; ZHAHG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p. 3389-3402, 1997.

ANON. Future directions for research on enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines for developing countries. **Weekly Epidemiological Record**, v. 81, p. 97–104, 2006.

BARATTO, L. C. Estudo químico-analítico e morfoanatômico de espécies medicinais brasileiras da família APOCYNACEAE: *Himatanthus lancifolius* (MÜLL. ARG.) WOODSON e *Rauvolfia sellowii* MULL. ARG. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas. UFPR: Curitiba, 2010.

BERCHIELLI, T. T. ; PIRES, A. V. ; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. III Simpósio de Gestão e Agronegócio, 2. ed. v. 1. 616 p. Jaboticabal - SP: FUNEP, 2011.

BOLTON, S. (1990) **Pharmaceutical Statistics - Practical and Clinical Applications**. New York: Marcel Dekker, 645 p.

BONFIELD, J.; BEAL, K.; JORDAN, M.; CHEN, Y.; STADEN, R. **The Staden Package Manual**. Editora: Copyright, 2002.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. v.2. New York: Springer, 2004.

CANNON, R. D.; HOLMES A.R., MASON A.B.; MONK, B. C. Oral candida: clearance, colonization, or Candidiasis? **Journal of Dental Research**, v. 74 (5), 1995.

CHEN, C.; SONG, F.; WANG, Q.; ABDEL-MAGEED, W. M.; GUO, H.; FU, C.; HOU, W.; DAI, H.; LIU, X.; YANG, N.; XIE, F.; YU, K.; CHEN, R.; ZHANG, L. A marine-derived *Streptomyces* sp. MS499 produces high yield of actinomycin X₂ and actinomycin D with potent anti-tuberculosis activity **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.95. p. 919-927, 2012.

CHUN, J., YOUN, H.-D., YIM, Y.-I., LEE, H., KIM, M. Y., HAH, Y. C. & KANG, S. O. *Streptomyces seoulensis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 492-498, 1997.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival – modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DEMAIN, A. L. From natural products discovery to commercialization: a success story. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 33, p. 486-495, 2006.

DEMAIN, A.L., SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 5-16, 2009.

FARBER, S., D'ANGIO, G., EVANS, A., MITUS, A. Clinical studies of actinomycin D with special reference to Wilms' tumor in children (Reprinted from Ann NY Acad Sci, v. 89, p. 421-425, 1960). **Journal Urology**, v. 168, p. 2560-2561, 2002.

FENICAL, W. H. **Drug Discovery from the New Marine Actinomycete Genus Marinomyces**. California Sea Grant College Program. Research Completion Reports, 2007. Disponível em: http://repositories.cdlib.org/csgc/rcr/NMP07_01. Acesso em: 09/10/2013.

GHANNOUM, M. A. ; JUREVIC, R.J.; MUKHERJEE, P.K.; CUI, F.; SIKAROODI, M.; NAQVI, A.; GILLEMET, P. M. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. **PLoS Pathogens**, v.6 (1), 2010.

HOLKAR, S. K.; BEGDE, D. N.; NASHIKKAR, N. A.; KADAM, T. A.; UPADHYAY, A. A. Optimization of some culture conditions for improved biomass and antibiotic production by *streptomyces spectabilis* isolated from soil. **International Journal Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4(8), p. 2980-2987, 2013.

JIN, X.; RAO, M.; WEI, W.; GE, M.; LIU, J.; CHEN, D.; LIANG, Y. Biosynthesis of new lipopentapeptides by an engineered strain of *Streptomyces* sp. **Biotechnology Letters**, v. 34 (12), p. 2283-2289, 2012.

KALAKOUTSKII, L. V.; ZENOVA, G. M.; SONA, V. S.; LIKHACHEVA, A. A. Associations of Actinomycetes with Algae. **Actinomycetes**, v. 1, p. 27-42, 1990.

KESAVAN, S. S.; BAVANILATHA, M.; VIJYALAKSHMI, R.; HEMALATHA, S. Analysis of bioactive constituents from a new *Streptomyces variabilis* strain Su5 by gas chromatography - mass spectrometry. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** v. 6 (1), p. 224-226, 2014.

KUROSAWA, K., BUI, V.P., VANESSENDELFT, J.L., WILLIS, L.B., LESSARD, P.A., GHIVIRIGA, I., SAMBANDAN, T.G., RHA, C.K., SINSKEY, A.J. Characterization of

Streptomyces MITKK-103, a newly isolated actinomycin X-2-producer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 145-154, 2006.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J.L. Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. **Advances in Endophytic Research**, p.231-256, 2014.

LACKNER, H., I. BAHNER; SHIGEMATSU, N.; PANNELL, L.; MAUGER, A. B. Structures of five components of the actinomycin Z complex from *Streptomyces fradiae*, two of which contain 4-chlorothreonine. **Journal of Natural Products**, v. 63(3), p. 352-356, 2000.

LIFFERTH, A., BAHNER, I., LACKNER, H., SCHAFER, M. Synthesis and structure of proline ring modified actinomycins of the X-type. **Zeitschrift fur Naturforsch. B**, v. 54, p. 681-691, 1999.

LU, Y.; DONG, X.; LIU, S. BIE, X. Characterization and Identification of a Novel Marine *Streptomyces* sp. Produced Antibacterial Substance. **Marine Biotechnology**, v.11 (6), p.717-24, 2009.

MAIA, P. P.; RATH, S.; REYES, F. G. R. **Antimicrobianos em Alimentos de Origem Vegetal - Uma Revisão**. Revista Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, Vol. 16(1). p. 49-64, 2009.

MACDONALD, E.; MØLLER, K. E.; WESTER, A. L.; DAHLE, U. R.; HERMSNSEN, N. O.; JENUM, P. A.; THORESEN, L.; VOLD, L. An outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection in Norway, 2012: a reminder to consider uncommon pathogens in outbreaks involving imported products. **Epidemiology Infection**, v. 143, p. 486–493, 2015.

MALDONADO, L. A.; STACH, J. E. M.; PATHOM, WARD, A. C.; BULL, A. T.; GOODFELLOW, M. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 87, p. 11-18, 2005.

MALDONADO, L.A.; FRAGOSO-YÁÑEZ, D.; PÉREZ-GARCIA, A.; DRUKER, J.; QUINTANA E. T. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 95, p. 111-120, 2009.

MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K.; KIM, S. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. **Microbiological Research**, v. 169 (4), p. 262–278, 2014.

MANUAL CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI (antigo NCCLS). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**. Norma Aprovada, 6 Ed., M7A6. v. 23(2), 2003.

MASON, K.; KATZ, E. Studies on the Biological Activities of Actinomycins Z1 and Z5. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 160, p.402-411, 1974.

MENDOZA, C.N.; BARRIENTOS, C. M.; PANIZZA, V. F.; CONCHA B. R.; ROMERO, P. P.; BARAHONA, C. F.; I. Prevención de la infección intrahospitalaria por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina mediante el manejo de portadores. **Revista Chilena de Infectología**, v. 17 (2), p. 129-134, 2000.

MINCER, T.J.; JENSEN P.R.; KAUFFMAN C.A.; FENICAL W. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5005–5011, 2002.

MONCIARDINI, P.; SOSIO, M.; CAVALLETTI, L.; CHIOCCHINI, C. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 419-429, 2002.

MUKAI, A.; FUKAI, T.; MATSUMOTO, Y.; ISHIKAWA, J.; HOSHINO, Y.; YAZAWA, K.; HARADA, K.; MIKAMI, Y. Transvalencin Z, a New Antimicrobial Compound with Salicylic Acid Residue from *Nocardia transvalensis* IFM 10065. **The Journal of Antibiotics**, v. 59 (6) p. 366–369, 2006.

NANJWADE, B.; CHADRASHEKHARA, S.; GOUDANAVAR, P. S.; SHAMAREZ, A. M.; MANVI, F. V. Production of Antibiotics from Soil-Isolated Actinomycetes and Evaluation of their Antimicrobial Activities. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9 (4). p. 373-377, 2010.

ORTEGA-MORALES, B. O.; CHAN-BACAB, M. J.; ROSA-GARCIA, S. C.; CAMACHO-CHAB, J. C. Valuable processes and products from marine intertidal microbial communities. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 346-352, 2010.

O’SULLIVAN, J. M.; JENKINSON, H. F.; CANNON, R. D. Adhesion of *Candida albicans* to oral Streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the Streptococcal cell surface. **Microbiology**, v. 146, p. 41-48, 2000.

PAN, E.; JAMISON, M.; YOUSSEFUDDIN, M.; MACMILLAN. Ammosamide d from marine-derived *Streptomyces variabilis*. **Planta Medica**. v. 78. p. 126, 2012.

PANDEY, A.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C.R.; DUSSAP, C.G. **Advances in fermentation technology**. India: New Delhi, p. 672, 2008.

PORSANI -AZUMA, M. V. Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil. p.1 - 95, Dissertação de Mestrado em Microbiologia. Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

PORSANI, M. V. Variabilidade Espacial de Fungos da Região Entre-Marés da Ilha do Mel – Paraná. Monografia de graduação em Ciências Biológicas – Centro de Estudos do Mar. Universidade Federal do Paraná, 2007.

PORSANI, M.V.; AMATUZZI, R. F.; OLIVEIRA, B. H.; BARATTO, L. C.; DALITZ, C. A.; BOZZA, A.; MARANGONI, P. R.; DALZOTO, P.R.; KOLM, H. E.; PIMENTEL, I. Antimicrobial potential of fungi and actinobacteria isolated from sandy sediments of intertidal regions. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3(3) p.899-913, 2013.

PROSSER, B. L.T.; PALLERONI, N. J. *Streptomyces longwoodensis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26. p. 319-322, 1976.

RAO, M.; JIN, X.; RUAN, L.; LUO, M.; SHENG, X. Identification of lipopeptide antibiotics and their biosynthetic gene cluster in *Streptomyces parvus* HCCB10043. **Chinese Journal of Pharmaceuticals**, v.43, p. 92-96, 2012

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2ª ed. São Paulo: Copyright, 2009.

SAADOUN, I.; ALAWAWDEH, M. Optimal Production Conditions, Cultural and Physiological Characterization of an Active-inhibitory Compound(s) Producing *Streptomyces* Bb36 Isolate

against Multiresistant Bacterial pathogens. **Current Trends in Biotchnology and Pharmacy**, v. 5(1), p. 998-1003, 2011.

SAJID, I.; SHAABAN, K. A.; HASNAIN, S. Identification, isolation and optimization of antifungal metabolites from the *Streptomyces malachitofuscus* CTF9. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42. p. 592-604, 2011.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America, Washington. v.74, p. 5463-5467, 1977.

SILVA, E. C. B. F.; SAMICO, T. M.; CARDOSO, R. R.; RABELO, M. A.; NETO, A. M. B.; MELO, F. L.; LOPES, A. C. S.; ACA, I. S.; MACIEL, M. V. Colonização pelo *Staphylococcus aureus* em profissionais de enfermagem de um hospital escola de Pernambuco. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.46 (1), p. 132-7, 2012.

SILVA, E. P. Desenvolvimento de Materiais Poliméricos para Uso em Cromatografia. 89p. Tese de doutorado em Ciências/ Química de Produtos Naturais – Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

SOFTWARE MINITAB 16. **Quality Analysis**. Minitab logo are registered trademarks of Minitab, Inc., iSn the U Minitab logo are registered trademarks of Minitab, Inc., in the United States and other countries, 2010.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A. P. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; BELEM-PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M. I.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de

plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazônica**, v. 34(2), p. 185-195, 2004.

SUNARYANTO, R.; MARWOTO, B.; HARTOTO, L.; MAS'UD, Z. A.; IRAWADI, T. T. Cyclo (Tyrosyl-Prolyl) Produced by: *Streptomyces* sp. Bioactivity and Molecular Structure Elucidation. **Microbiology**, v. 5 (2). p. 81-87, 2011.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p.1596-1599, 2006.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 71(3), p. 495–548, 2007.

VIJAYALAKSHMI, N.; SUDHA, S.S. A Report on Antimicrobial Activity of Actinomycete, *Streptomyces* S12c Species. **International Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 2 (3). p. 225-231, 2011.

XIN, Y.; KANAGASABHAPATHY, M.; JANUSSEN, D.; XUE, S.; ZHANG, W. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from Antarctic deep-sea sponges. **Polar Biology**, v. 34. p. 1501-15012, 2011.

YOUN, H.; KWAK, J.; YOUN, H.; HAH, Y. C.; KANG, S. Lipoamide dehydrogenase from *Streptomyces seoulensis*: Biochemical and genetic properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.13880. p. 405-418. 1998.

YOUN, H.; KANG, S. Enhanced sensitivity of *Streptomyces seoulensis* to menadione by superfluous lipoamide dehydrogenase. **FEBS Letters**. v.472. p. 57-61, 2000.

YU, J. Q.; LIU, Q.; LIU, X.; SUN, Q.; YAN, J.; QI, X.; FAN, S. Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. **Revista Bioresource Technology**, v. 99. p. 2087-2091, 2008.

YU, Y.; LI, H.; ZENG, Y.; CHEN, B. Phylogenetic diversity of culturable bacteria from Antarctic Sandy intertidal sediments. **Polar Biology**, v. 33, p. 869-875, 2009.

YUNG, B. Y-M.; BUSCH, H.; MAUGER, A.B.; CHAN, P-K. Effects of actinomycin d analogs on nucleolar phosphoprotein B23 (37,000 DALTONS/pI 5.1). **Biochemical Pharmacology**, v. 34 (22), p. 4059-4063, 1985.

ZHANG, X.; REN, K.; ZHANG, L. Screening and Preliminary Identification of Medicinal Plants Endophytic Actinomycetes Used for Inhibiting Penicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Biology**, v.4 (2), p. 119-124, 2012.

CAPÍTULO 3

AÇÃO ENTOMOPATOGÊNICA DE *Streptomyces longwoodensis* sobre *Brevicoryne brassicae* (HEMIPTERA: APHIDIDAE)

RESUMO

O gênero *Streptomyces* se destaca pela produção de metabólitos secundários, com milhares de compostos bioativos documentados e muitos com potencial para o desenvolvimento de bioinseticidas. A maioria dos isolados estudados é proveniente de organismos ou ambientes terrestres. Entretanto, isolados de ambientes marinhos ainda são pouco avaliados quanto ao seu potencial inseticida. Este trabalho avaliou o potencial entomopatogênico de *S. longwoodensis* de origem marinha sobre *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae). Os resultados indicaram que *S. longwoodensis* translocou por folhas de plântulas de couve manteiga e que ninfas de 2º instar, ao se alimentar destas plantas, foram afetadas. Estes afídeos foram expostos a seis diferentes concentrações ($1,5 \times 10^3 - 10^8$ UFC/mL), permitindo estimar uma CL_{50} de $0,32 \times 10^6$ UFC/mL. Além de propriedades inseticidas, *S. longwoodensis* apresentou fagodeterrência sobre a alimentação de adultos nas concentrações de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL e 10^9 UFC/mL. Neste contexto, *S. longwoodensis* possui atividade entomopatogênica, com potencial para ser um promissor agente de controle de pragas agrícolas.

Palavras-chave: Afídeo, controle biológico, actinobactéria, *Brassica oleracea*, ação fagodeterrente

ABSTRACT

The genus *Streptomyces* is distinguished by production of secondary metabolites with thousands of documented compounds and of them are bioactive with potential for the development of biopesticides. Most of the isolates are from terrestrial organisms or environments. By another hand, isolated from marine environments are still poorly evaluated for their potential insecticide. This study evaluated the potential of entomopathogenic *S. longwoodensis* of marine origin on *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae). The results showed that *S. longwoodensis* translocated by kale leaf seedlings and second instar nymphs that feed these plants were affected. These aphids were exposed to six different concentrations (1.5×10^3 - 10^8 CFU/mL), allowing to estimate an LC_{50} of 0.32×10^6 CFU/mL. In addition to insecticidal properties, *S. longwoodensis* antifeedant activity presented on adults feeding at concentrations of 1.5×10^5 CFU/ml and 10^9 CFU/mL. In this context, *S. longwoodensis* has entomopathogenic potential, candidate to be a promising control agent of agricultural pests.

Keywords: Aphid, biological control, actinobacteria, kale, antifeedant activity

1 INTRODUÇÃO

A couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*) é uma das plantas mais cultivadas no mundo para alimentação humana (FAOStat, 2014). Um dos grandes problemas da cultura é a ocorrência de pragas, com destaque para *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphidae) (MA *et al.*, 2010). Os danos de *B. brassicae* estão associados à sucção da seiva e a transmissão de vírus, causando perdas de até 100 % (ALFORD, 2000). Além disso, a excreção de uma secreção açucarada, *honeydew*, favorece o desenvolvimento de fungos sobre as folhas (ASI *et al.*, 2009) e atraem formigas que promovem sua proteção, causando danos em áreas agrícolas (BARTON; IVES, 2014). Seu status de praga primária é reforçado pela capacidade de reprodução, com uma fêmea gerando até cinco ninfas por dia por até um mês (MUNTHALI, 2011).

Para reduzir os danos causados por *B. brassicae*, produtores fazem pulverizações sistemáticas com inseticidas químicos. No Brasil, o controle do afídeo é feito com pesticidas de

ampla espectro, como neonicotinoides, piretroides e organofosforados (MAPA, 2015). O uso excessivo destes inseticidas tem causado a eliminação de inimigos naturais (BERNARDI, 2012), ressurgência de pragas (POLETTI *et al.*, 2008), contaminação ambiental e humana, seleção de insetos resistentes (QUARCCO; TACKIE, 2014), além de colocar a couve entre os produtos com maior residual de pesticidas (ANVISA, 2011). Diante deste cenário, o uso de biopesticidas pode permitir um manejo mais racional de *B. brassicae*. Biopesticidas podem reduzir impactos ambientais, causar menor risco à saúde humana, preservar inimigos naturais (PELL *et al.*, 2010) e retirar a cultura dentre os produtos agrícolas com elevado residual inseticida.

Nesse contexto, o estudo de actinobactérias vem ganhando interesse devido ao seu potencial para o controle de pragas (VIJAYABHARATHI *et al.*, 2014). Actinobactérias como as do gênero *Streptomyces* têm se destacado no controle de insetos de diversas ordens (BREAM *et al.*, 2001; HUSSAIN *et al.*, 2002; SUNDARAPANDIAN *et al.*, 2002; GADELHAK *et al.*, 2005; OSMAN *et al.*, 2007; DHANASEKARAN *et al.*, 2010; ARASU *et al.*, 2013). Sua capacidade entomopatogênica pode estar ligada à síntese de diversos metabólitos que podem ser promissores princípios ativos para o desenvolvimento de novos biopesticidas (ANWAR *et al.*, 2014; BLAAK *et al.*, 1993; KAMEI *et al.*; BRICEÑO *et al.*, 2015; BOX *et al.*, 1973). Dessa forma, a grande maioria dos isolados promissores de *Streptomyces* avaliados no controle de pragas são coletados de organismos ou ecossistemas terrestres (QIN *et al.*, 2011), sendo que avaliações de *Streptomyces* de ambientes marinhos podem revelar linhagens promissoras, pois podem produzir novos compostos químicos (IKEDA *et al.*, 2003; AMADOR *et al.*, 2003; HOPWOOD, 2007; IMADA, 2005).

A exploração da diversidade presente em ambientes marinhos tem elevado potencial para o desenvolvimento de novos produtos (DUNCAN *et al.*, 2014). Apesar desses ambientes abrangerem mais de 70 % da superfície terrestre (DIONISI *et al.*, 2012), sua exploração é incipiente (FELING *et al.*, 2003; JENSEN *et al.*, 2007; HUGLES *et al.*, 2008). *Streptomyces* isolados destes ambientes podem ser promissores agentes de controle biológico. Por estarem expostos a alta salinidade, temperatura, radiação UV e baixos níveis de nutrientes (PORSANI *et al.*, 2013), sofrem diferenciações fisiológicas que podem promover a produção de enzimas e toxinas que possibilitam sua sobrevivência nesse ambiente hostil (ORTEGA-MORALES *et al.*, 2010).

A fim de encontrar promissores agentes de biocontrole, eficazes para o manejo de pragas, um isolado marinho, identificado como *Streptomyces longwoodensis* (Genbank: JX997145) (PORSANI *et al.*, 2013) teve seu potencial entomopatogênico avaliado contra *B. brassicae*. Para

isso foram estimadas a CL_{50} de *S. longwoodensis* sobre ninfas de 2º instar de *B. brassicae* e verificada a ação fagodeterrente, ou seja, a paralisação da alimentação sobre a alimentação de adultos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CRIAÇÃO DE *Brevicoryne brassicae*

A criação em laboratório de *B. brassicae* foi estabelecida por meio de coleta de afídeos em áreas olerícolas da região de Curitiba, Paraná, Brasil. Os insetos coletados em campo foram transportados ao laboratório onde passaram por triagem e posteriormente foram inoculados sobre couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) e mantidos em condições controladas (25 ± 1 °C, fotofase: 12 h e UR: 70 ± 10 %) no Laboratório Profº Ângelo Moreira da Costa Lima. Lâminas de exemplares adultos foram confeccionadas para confirmação da espécie.

2.2 ACTINOBACTÉRIA

O isolado de *S. longwoodensis* foi coletado em sedimentos marinhos localizados na região entre-marés da Ilha do Mel, Paraná ($25^{\circ}20'S - 48^{\circ}20'W$ e $25^{\circ}35' - 48^{\circ}35'W$) (PORSANI *et al.*, 2013). Este isolado foi cultivado em placas de Petri com meio Czapek Dox, por sete dias em estufa B.O.D. à 35 °C.

2.3 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA DE *S. longwoodensis*

Para estimativa da CL_{50} de *S. longwoodensis* foram utilizadas seis concentrações (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 UFC/mL) que proporcionaram uma mortalidade entre 5 e 95 % de ninfas de *B.*

brassicae. Estas suspensões bacterianas foram preparadas a partir da raspagem das colônias sobre meio de cultura Czapeck Dox utilizando uma espátula metálica esterilizada. Para estimar a concentração de células foi utilizada a Escala de MacFarland, ajustada em 3×10^9 UFC/mL. Esta suspensão foi diluída serialmente, nas concentrações de 3×10^4 a 10^8 UFC/mL.

Após o preparo das suspensões com *S. longwoodensis*, mudas de couve-manteiga foram lavadas com etanol 70 % (30 seg), hipoclorito de sódio (0,5 %) (1 min) e enxaguadas com água destilada esterilizada duas vezes e mantidas por uma hora em ambiente protegido e ventilado até a secagem (FIGURA 11A e B). Após a secagem das mudas, folhas com pecíolos foram destacadas, tendo seus pecíolos imersos em um tubo de penicilina (10 mL) contendo 5mL de cada uma das diferentes concentrações das suspensões da actinobactéria (FIGURA 11C).

Posteriormente, com o auxílio de um microscópio estereoscópio e pincel de cerdas finas, foram inoculadas dez ninfas de *B. brassicae*, com 0 a 48 h de idade, por folha. Para obter as ninfas, 20 adultos foram inoculados em discos foliares de couve-manteiga com 8 cm de diâmetro e mantidos em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo uma camada de 1 cm de meio ágar/água a 2 % (FIGURA 11D). Após 48 h as placas foram vistoriadas e as ninfas coletadas e utilizadas nos experimentos (FIGURA 11E). As folhas inoculadas com ninfas de *B. brassicae* (FIGURA 11F) foram acondicionadas em potes plásticos com tampas perfuradas e vedadas com tecido *voil* e mantidas em condições controladas (25 ± 1 °C, fotofase: 12 h e UR: 70 ± 10 %) (FIGURA 11G).

As avaliações de mortalidade foram realizadas em intervalos de 24 h, durante 72 h. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, as ninfas eram vistoriadas e os insetos mortos eram individualizados em placas de Petri esterilizadas contendo algodão umedecido com água destilada esterilizada para favorecer o desenvolvimento do micélio.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Além das diferentes concentrações da actinobactéria, foi empregado um controle contendo água destilada esterilizada. Para cada concentração foram realizadas cinco repetições. Cada repetição foi formada por quatro placas de Petri com dez ninfas de 48 h de *B. brassicae*. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de probit pelo programa Polo-PC (LEORA SOFTWARE, 1987).



FIGURA 13 - ETAPAS DESENVOLVIDAS PARA CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA DE *S. longwoodensis*. A: Mudanças de *Brassica oleracea* var. *acephala*; B: Processo de desinfecção superficial de folhas de couve álcool 70 % (30''); hipoclorito 3 % (1'); água destilada (1'); água destilada (1'); C: Pecíolo da planta envolto em algodão umedecido em tubo de penicilina contendo 10 mL de suspensão bacteriana e o controle com 10 mL de água destilada; D: Discos foliares preparados para obtenção de ninfas de 48 h; E, F: Transferência das plantas ninfas de 1º instar *B. brassicae*; G: Etapa final da montagem do bioensaio com a vedação das mudas com gaiolas de plástico.

Fonte: O autor

2.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR

A ação de *S. longwoodensis* sobre o comportamento alimentar de *B. brassicae* foi avaliada pela excreção de *honeydew*. Para isso plântulas de couve foram higienizadas (Item 2.3) e acondicionadas em recipientes de vidro contendo soluções ajustadas a $1,5 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^9$ UFC/mL de *S. longwoodensis*. Após 24 h, uma folha foi selecionada, sendo as demais eliminadas e sobre a parte abaxial desta folha foi feita uma arena com cola entomológica (Tanglefoot®), sendo posteriormente transferidos dois afídeos adultos, deixados sem alimentação por uma hora.

As plântulas com os afídeos foram posicionadas horizontalmente em suportes para que a face abaxial ficasse sobre discos de papel filtro (11 cm de diâmetro, gramatura 80 g/m², porosidade 14 µm) impregnados com uma solução contendo 3mL de ácido acético, 10 mL de n-butano e 0,3 g de ninhidrina (MITTLER, 1958). Essa solução colore o aminoácido presente no *honeydew* excretado por insetos. Os discos de papel filtro foram montados sobre relógios analógicos

(COSTA *et al.*, 2009) de modo a fazerem uma rotação completa sobre seu eixo em 12 h. As plantas com os afídeos foram mantidas em condições controladas por 12 h (temperatura: 25 ± 1 °C; UR: 70 % e fotofase de 12 h). Os afídeos foram removidos e os discos avaliados quanto ao número de gotas de *honeydew* excretadas. Além das concentrações de $1,5 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^9$ UFC/mL de *S. longwoodensis*, foi empregado um controle onde as plantas foram mantidas somente em água destilada esterilizada. Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições.

Os dados sobre o comportamento alimentar de *B. brassicae* foram transformados pelo arco seno da raiz quadrada para normalização das distribuições e homogeneidade das variâncias (HADDAD & VENDRAMIN, 2000) e avaliados por análise de variância (ANOVA). O percentual médio (\pm EPM) de insetos mortos foi submetido a uma análise de variância simples (*One-way* ANOVA). Diferenças significativas entre as médias dos tratamentos foram submetidas ao teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) (ZAR, 2009).

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA DE *S. longwoodensis*

A caracterização toxicológica de *S. longwoodensis* sobre ninfas de *B. brassicae* expostas por 72 h foi estimada em CL_{50} de $0,32 \times 10^6$ UFC/mL. A mortalidade observada após 72 h, ajustou-se ao modelo de Probit, obtendo-se um χ^2 de 0,903 e heterogeneidade de 0,23, sendo estimado um coeficiente angular de 0,331 ($\pm 0,07$) (TABELA 6).

TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA DE *S. longwoodensis* OBTIDO SOBRE NINFAS COM 48 h DE IDADE DE *Brevicoryne brassicae* APÓS 48 h DA EXPOSIÇÃO. Temp. 26 ± 2 °C, e 14 h de fotofase e UR 70 ± 10 %

n ¹	CL ₅₀ (IC95 %) ²	Coeficiente angular (\pm EPM) ³	χ^2 (g.l.) ⁴	h ⁵
1075	$0,32 \times 10^6$ UFC/mL ($0,202 \times 10^5 - 0,22 \times 10^7$)	0,331 ($\pm 0,07$)	0,903 (4)	0,23

¹ Número de insetos testados; ² Intervalo de Confiança; ³ Erro Padrão da Média; ⁴ Graus de Liberdade; ⁵ Heterogeneidade

3.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE *B. brassicae* EXPOSTOS A *S. longwoodensis*

As diferentes concentrações de *S. longwoodensis* interferiram na excreção de *honeydew* de *B. brassicae*. A excreção de *honeydew* de adultos de *B. brassicae* mantidos em plantas de couve sem a actinobactéria, em um período de 12 h, foi significativamente diferente da concentração de 10^9 UFC/mL (F: 9,46; g.l.: 2,12; $p = 0,0034$). Os afídeos que se alimentaram de plantas controle excretaram 7,4 gotas de *honeydew*, enquanto que aqueles expostos a 10^9 UFC/mL excretaram em média 2,4 gotas, o que significa uma diminuição de 67,57 % (FIGURA 12). Apesar de não haver diferenças significativas na excreção de *honeydew* de afídeos expostos ao controle e a concentração de 10^5 UFC/mL, houve uma redução na excreção de 35 % (FIGURA 12). Essa redução é um indicativo da alteração no comportamento alimentar de *B. brassicae* na presença da actinobactéria, quando comparadas com o controle. Já a ausência de diferenças entre as concentrações são um indicativo de que baixas concentrações do patógeno já são suficientes para reduzir a alimentação do afídeo.

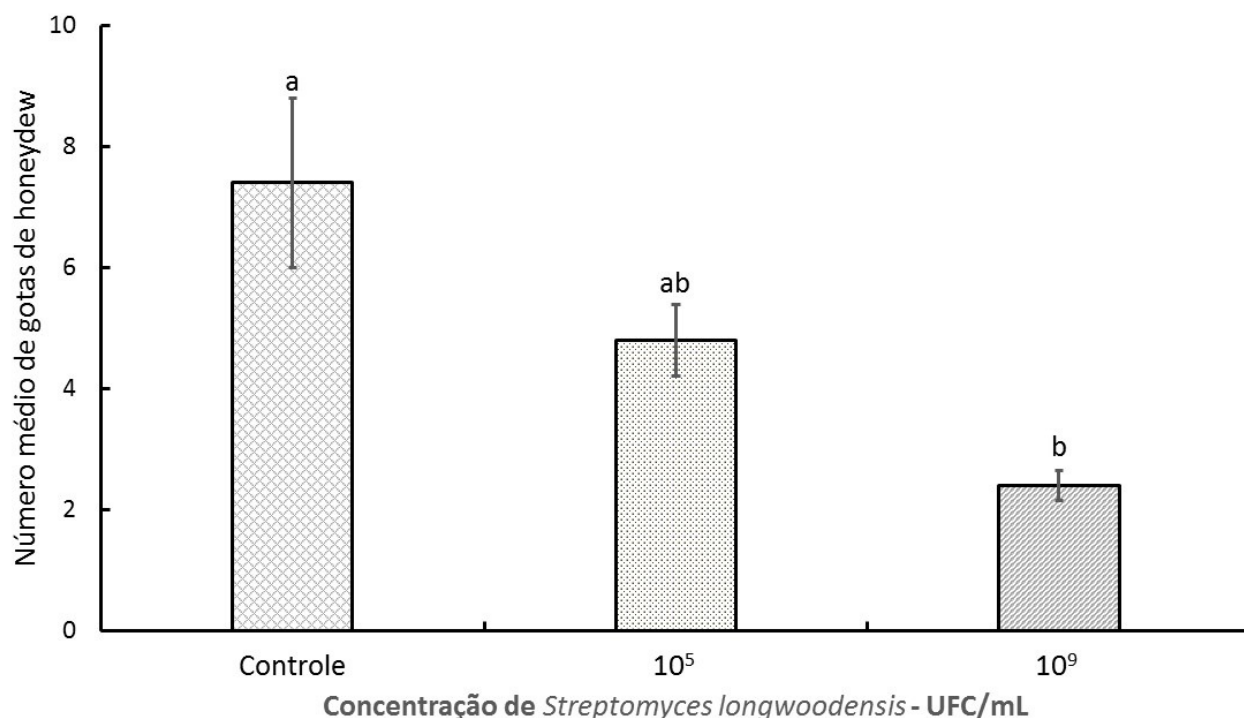


FIGURA 14. NÚMERO DE GOTAS DE *HONEYDEW* EXCRETADAS POR *B. brassicae* NO PERÍODO DE 12 h DE EXPOSIÇÃO À ACTINOBACTÉRIA ENTOMOPATOGÊNICA *S. longwoodensis*. Letras distintas nas concentrações diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

A actinobactéria *S. longwoodensis* pode ser considerada um potente agente de controle biológico. Os resultados indicam que *S. longwoodensis* translocou-se pelo tecido foliar e causou a mortalidade de ninfas de 2º instar de *B. brassicae* que se alimentaram da seiva floemática da planta. A capacidade de bactérias circularem endofiticamente foi demonstrada para *Bacillus thuringiensis*, em plantas de algodão que absorveram a bactéria do solo e promoveram o controle de lepidópteros, pragas dessa cultura (MONNERAT *et al.*, 2003). Estudos com algodão e couve tratados com *B. thuringiensis* marcados com gfp (*green fluorescence protein*) demonstraram que a bactéria é capaz de colonizar as plantas e controlar pragas destas culturas como *Spodoptera frugiperda* e *Plutela xylostela*, respectivamente (MONNERAT *et al.*, 2009). Dessa forma, Praça *et al.* (2012) comprovaram a capacidade de penetração e colonização de *B. thuringiensis* em raízes,

caules e folhas de plântulas de repolho, o que pode fornecer novos métodos de controle para pragas desta cultura.

Essa capacidade de bactérias entomopatogênicas translocarem-se na planta possibilita o seu uso no controle de insetos sugadores. Neste contexto, a marcação de uma estirpe de *B. thuringiensis* com gfp permitiu a visualização da bactéria em afídeos *Aphis gossypii* que se alimentaram em plantas de algodão tratadas (MELATTI *et al.*, 2008). Assim como para *B. thuringiensis*, o gênero *Streptomyces* pode ser encontrado de modo endofítico (CASTILHO *et al.*, 2002) e possui a habilidade de penetrar e colonizar sua planta hospedeira promovendo sua proteção contra micro-organismos fitopatogênicos e contra insetos (BONALDI *et al.*, 2015). Neste sentido, é possível que o inóculo de *S. longwoodensis* presente na solução empregada para manter as folhas de couve turgidas tenha sido absorvido pelo xilema e translocado para o floema, causando a morte de ninfas de *B. brassicae* ao se alimentar da planta, resultando em uma CL₅₀ de $0,32 \times 10^6$ UFC/mL, estimada após 72 h da inoculação de insetos sobre a planta.

A CL₅₀ obtida para *S. longwoodensis* é um indicativo de sua ação entomopatogênica. Esta CL₅₀ foi inferior à verificada para actinobactéria *S. variabilis*, que apresentou uma CL₅₀ de $0,20 \times 10^7$ UFC/mL, com 100 % de mortalidade após 120 h (PACHECO, 2015). Além de *S. longwoodensis* proporcionar uma CL₅₀ menor que a verificada para *S. variabilis*, o tempo de exposição foi 40 % menor. Estes resultados indicam que *S. longwoodensis* pode apresentar uma toxicidade maior para o afídeo que *S. variabilis*. Berlitz *et al.* (2013) obtiveram a CL₅₀ de $2,6 \times 10^6$ UFC/mL para a bactéria *Bacillus thuringiensis* contra *Meloidogyne* sp. Do mesmo modo, a inoculação de *B. thuringiensis*, empregando-se a exposição de células *in vivo*, apresentou uma CL₅₀ de $1,8 \times 10^7$ UFC/mL sobre larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Crambidae), com uma mortalidade de 16 % após 72 h (SNEH E GASITH, 1983). A menor CL₅₀ apresentada por *S. longwoodensis* pode estar associada à produção de metabólitos com propriedades entomopatogênicas.

O gênero *Streptomyces* se destaca pela produção de metabólitos, com mais de 10.000 compostos bioativos documentados (ANDERSON E WELLINGTON, 2001), muitos destes com potencial para o desenvolvimento de novos bioinseticidas (TAMURA *et al.*, 1963; BOX *et al.*, 1973). Os produtos naturais têm permitido a síntese de inseticidas com novos modos de ação sobre pragas, causando impactos sobre a área agroquímica (LEWER *et al.*, 2003) e despertando o interesse de grandes indústrias deste segmento. Um exemplo é a actinobactéria *S. avermitilis*, o qual foi isolado um complexo de metabólitos denominados avermectinas (BURG *et al.*, 1979), que originaram uma nova classe de inseticidas (LASOTA; DYBAS, 1991; CAMPBELL, 2012). Além

das avermectinas, a bioprospecção tem revelado outros metabólitos, como a doramectina com potencial entomopatogênico, sintetizados por diferentes espécies ou isolados de *Streptomyces* (JIZBA *et al.*, 1992; TAMURA *et al.*, 1963; LEWER *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2011).

A redução na excreção de *honeydew* verificada para *B. brassicae* pode indicar ação fagodeterrente de *S. longwoodensis*. Esta ação ocorre após o início da alimentação: se o inseto for estimulado a manter-se alimentando, a substância será chamada de fagoestimulante, mas se o inseto paralisar a alimentação, a substância será fagodeterrente (VENDRAMIN; CASTIGLIONE, 2000). A adoção de metodologias que mensuram o índice de consumo alimentar de afídeos por meio de sua excreção está embasada no pressuposto de que a quantidade de seiva ingerida e assimilada pelo afídeo é pequena em relação ao peso total do alimento ingerido (WILKINSON; DOUGLAS, 1995).

Deste modo, a menor excreção de *honeydew* causada pela concentração de 10^9 UFC/mL pode estar associada a efeitos subletais causados por *S. longwoodensis*. Embora as concentrações utilizadas para determinar da CL₅₀ tenham sido efetivas sobre ninfas com até 48 h de idade, é provável que esta concentração não seja letal para adultos. Essa baixa toxicidade está ligada ao período de exposição (24 h) e também ao maior tamanho corporal de adultos, quando comparado com ninfas. A ocorrência de fagodeterência causada por *Streptomyces* sobre insetos foi verificada por Kaur *et al.* (2014). A adição de uma substância extraída de *S. hydrogenans* sobre a dieta alimentar de *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) causou a redução alimentar de lagartas, promovendo a redução do tamanho e o atraso no desenvolvimento do inseto.

Neste contexto, estudos exploratórios visando à identificação de metabólitos tem se intensificado, revelando espécies de *Streptomyces* com potencial para o controle de pragas (KEKUDA *et al.*, 2010; EL-KHAWAGH *et al.*, 2011). Linhagens isoladas de sedimento marinho, como a empregada neste trabalho, se desenvolvem em condições extremas de salinidade, nutrição, alta pressão, radiação UV e temperatura, competindo com outros fungos, bactérias e vírus, fazendo com que desenvolvam metabólitos secundários diferenciados dos encontrados em micro-organismos terrestres. A ação letal e subletal sobre ninfas e adultos de *B. brassicae* apresentados por *S. longwoodensis* fazem deste micro-organismo isolado de ambiente marinho um candidato promissor para o controle biológico de pragas agrícolas.

5 CONCLUSÃO

S. longwoodensis possui potencial entomopatôgenico e ação fagodeterrente sobre *B. brassicae* nas concentrações CL_{50} $0,32 \times 10^6$ UFC/mL e $1,5 \times 10^9$ UFC/mL, respectivamente.

6 REFERÊNCIAS

ALFORD, D. V. **British Crop Protection Council. Pest and disease management handbook.** 4 ed. Oxford: Blackwell Science, 2000.

AMADOR, M.L.; JIMENO J.; PAZ-ARES, L. ; CORTES-FUNES H.; HIDALGO, M. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. **Annals of Oncology**, v.14, p.1607-1615, 2003.

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**, 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acessado em: 05/02/2015.

ANWAR, S.; ALI, B.; QAMAR, F.; SAJID, I. Insecticidal Activity of Actinomycetes Isolated from Salt Range, Pakistan against Mosquitoes and Red Flour Beetle. **Pakistan Journal. Zoology**, v. 46(1), p. 83-92, 2014.

ANDERSON, A. S.; WELLINGTON, E. M. H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **International Journal of Systematic and evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 798-814, 2001.

ARASU, M. V.; AL-DHABI, N.A.; SARITHA, V.; DURAIPANDIYAN, V.; MUTHUKUMAR, C.; KIM, S. J. Antifeedant, larvicidal and growth inhibitory bioactivities of novel polyketide metabolite isolated from *Streptomyces* sp. AP-123 against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **BMC Microbiology**, v. 13, p.105, 2013.

ASI, M. R.; BASHIR, M. H.; MIRZA, J. H.; AFZAL, M.; IMRAN, S. In vitro efficacy of entomopathogenic fungi against cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*. **Pakistan Entomologist**. v.31(1), 2009.

BARTON, B. T.; IVES, A. R. Direct and indirect effects of warming on aphids, their predators and ants mutualists. **Ecology**, v. 95, p. 1479-1484, 2014.

BERLITZ, L. D.; SAUL, D. A.; MACHADO, V.; SANTIN, R. C.; GUIMARÃES, M. A.; MATSUMURA, A. T. S.; RIBEIRO, M. B.; FIUZA, M. L. 2013. *Bacillus thuringiensis*: molecular characterization, ultrastructural and nematotoxicity to *Meloidogyne* sp. **Journal of Biopesticide**, v.6, n.1, p. 120-128, 2013.

BERNARDI, D.; GARCIA, M. S.; BOTTON, M.; CUNHA, U. S. Efeito da Azadiractina sobre *Chaetosiphom fragaefolli* (Cockereli, 1901) (Hemiptera: Aphididae) na cultura do morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 93-101, 2012.

BLAAK, H.; SCHNELLMANN, J.; WALTER, S.; HENRISSAT, B.; SCHREMPF, H. Characteristics of an exochitinase from *Streptomyces olivaceoviridis*, its corresponding gene, putative protein domains and relationship to other chitinases. **Journal of Biochemistry**. v.214, p.659-669, 1993.

BONALDI M, CHEN X, KUNOVA A, PIZZATTI C, SARACCHI M AND CORTESI P Colonization of lettuce rhizosphere and roots by tagged *Streptomyces*. **Frontiers in Microbiology**, v.6 (25), p. 1-10, 2015.

BOX, S. J.; COLE, M.; YEOMAN, G. H. Prasinons A and B: Patent insecticides from *Streptomyces prasianus*. **Applied Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 699 -704, 1973.

BREAM, A.S.; GHAZAL, S.A.; EL-AZIZ, Z. K. A.; IBRAHIM, S.Y. Insecticidal activity of selected actinomycetes strains against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent**, V.66, p. 503-544, 2001.

BRICENO, G.; FUENTES, M. S.; RUBILAR, O.; JORQUERA, M.; TORTELLA, G.; PALMA, G.; AMOROSO, M. J.; DIEZ, M. C. Removal of the insecticides diazinon from liquid media by free and immobilized *Streptomyces* sp. isolated from agricultural soil. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, p. 293-302, 2015.

BURG, R. W.; MILLER, B. M.; BAKER, E. E.; BIRBAUM, J.; CURRIE, S. A.; HARTMAN, R.; KONG, Y.; MONAGHAN, L. R.; OLSON, G.; PUTTER, I.; TUNAC, J. B.; WALLICK, H.; STAPLEY, E. O.; OIWA, R.; OMURA, S. Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 15, n. 3, p. 361-367, 1979.

CAMPBELL, W. C. History of Avermectin and Ivermectin, with Notes on the History of Other Macrocyclic Lactone Antiparasitic Agents. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p. 853-865, 2012.

CASTILHO, U.F.; STROBEL, G.A.; FORD, E.J.; HESS, W.M.; PORTER, H.; JENSEN, J.B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M.A.M.; TEPLow, D.B. ; STEVENS, D.; YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. **Microbiology**, v. 148, p.2675-2685, 2002.

COSTA, R. R.; MORAES, J. C.; COSTA, R. R. Interação silício-imidacloprid no comportamento biológico e alimentar de *Schizaphis Graminum* (Rond.) (Hemiptera: Aphididae) em plantas de trigo. **Ciência Agrotécnica**, v. 33, n. 2, p. 455-460, 2009

CUPPELS, D.A.; HIGHAM, J.; TRAQUAIR, J. A. Efficacy of selected Streptomyces and a Streptomyces + pseudomonad combination in the management of selected bacterial and fungal diseases of field tomatoes. **Biological Control**, v. 67, p. 361-372, 2013.

DHANASEKARAN, D.; SAKTHI, V.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A. Preliminary evaluation of *Anopheles* mosquito larvicidal efficacy of mangrove actinobacteria. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 1, p. 374-381, 2010.

DIONISI, H. M.; LOZADA, M.; OLIVEIRA, N. L. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 44, p. 49-60, 2012.

DUNCAN, K.; HALTLI, B.; GILL, K. A.; KERR, R. G. Bioprospecting from Marine Sediments of New Brunswick, Canada: Exploring the Relationship between Total Bacterial Diversity and Actinobacteria Diversity. **Marine Drugs**, v. 12, p. 899-925, 2014.

EL-KHAWAGH, M. A.; HAMADAH, K. S.; EL-SHEIKH, T. M. The insecticidal activity of actinomycetes metabolites, against the mosquito *Culex pipiens*. **Egyptian of Academic Journal Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 103-113, 2011.

FELING, R. H.; BUCHAN, G. O.; MINCER, T. J.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, p. 355-357, 2003.

FAOStat. **Food and Agriculture Organization of United Nations Statistics Division**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org>. Acessado em: 4/12/2014.

GADELHAK, G. G.; EL-TARABILY, K. A.; AL- KAABI, F. K. Insect control using chitinolytic soil actinomycetes as biocontrol agents. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.7, p. 627-633, 2005.

HADDAD, M. L.; VENDDRAMIN, J. D. Comparação de porcentagens observadas com casos extremos de 0 e 100 %. **Anais da sociedade entomológica do Brasil**, v. 29, n. 4, p. 835-837, 2000.

HOPWOOD, D.A. Therapeutic treasures from the deep. **Nature Chemical Biology**, v.3, p. 457-458, 2007.

HUGHES, C. C.; PRIETO-DAVO, A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. The marinopyrroles, antibiotics of an unprecedented structure class from a marine *Streptomyces* sp. **Organic Letters**, v. 10, p. 629-631, 2008.

HUSSAIN, A. A.; MOSTAFA, S. A.; GHAZAL, S. A.; IBRAHIM, S. Y. Studies on antifungal antibiotic and bioinsecticidal activities of some actinomycete isolates. **African Journal of Mycology and Biotechnology**, v.10, p. 63-80, 2002.

IKEDA, H.; ISHIKAWA, J.; HANAMATO, A.; SHINOSE, M.; KIKUCHI, H.; SHIBA, T. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. **Nature Biotechnology**, v.21, p. 526-531, 2003.

IMADA, C. Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. **Antonie. Leeuwenhoek**, v.87, p. 59-63, 2005.

JENSEN, P.R.; WILLIAMS, P.G.; DONG-CHAN, O.; ZEIGLER, L.; FENICAL, W. Species-Specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1146-1152, 2007.

JIZBA, J.; SAMOUKINA, G. V.; IVANOVA-KOVACHEVA, T.; KANDYBIN, N. V. Insecticidal Activity of Pyrrolizine Derivatives Isolated from *Streptomyces griseus*. **Folia Microbiologica**, v. 37(6), p. 461-462, 1992.

KAMEI, K., YAMAMURA, Y., HARA, S. AND IKENAKA, T. Amino acid sequence of chitinase from *Streptomyces erythraeus*. **Journal of Biochemistry**, v. 105, p. 975-979, 1989.

KAUR, T.; VASUDEV, A.; SOHAL, S. K.; MAHAS, R. K. Insecticidal and growth inhibitory potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16 on major pest of India, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Microbiology**, v. 14, p. 1-9, 2014.

KEKUDA, T. R. P.; SHOBLA, K. S.; ONKARAPPA, R. Potent insecticidal activity of two *Streptomyces* species isolated from the soils of the Western ghats of Agumbe, Karnataka. **Journal of Natural Pharmaceuticals**, v. 1, n. 1, p. 30 -302, 2010.

LASOTA, J. A.; DYBAS, R. A. Avermectins, a novel class of compounds: Implications for Use in Arthropod Pest Control. **Annual Review of Entomology**, v. 36, p. 91-117, 1991.

LEORA SOFTWARE. **POLO-PC**: A USER'S GUIDE TO Probit or logit analysis. Berkeley. 20p. 1987.

LEWER, P.; CHAPIN, E. L.; GRAUPNER, P. R.; GILBERT, J. R.; PEACOCK, C. Tartrolone C: A novel insecticidal macrodiolide produced by *Streptomyces* sp. CP1130. **Journal Natural Products**, v. 66, p. 143-145, 2003.

MA, J.; TONG, S. M.; WANG, P.; LIAO, H.; ZHANG, L. Insecticides activity of Camptothecin against *Nilaparvata lugens*, *Brevicoryne brassicae* and *Chilo suppressalis*. **Journal Economic Entomology**, v. 103, n. 3, p. 492-496, 2010.

MAPA – **Inseticidas recomendados para o manejo de *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera, Aphididae) em couve**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: < <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit>. Acesso em: 05/01/2015.

MELLATI, M. V.; MARTINS, E.; PRAÇA, L. B.; BERRY, C.; SUJII, E.; MONNERAT, R. G. Boletim de pesquisa de desenvolvimento 217 - Elaboração de metodologia de bioensaio seletivo e de dose de *Bacillus thuringiensis* contra o pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

MITTLER, T. E. Studies on the feeding and nutrition of *Tuberolachnus salignus* (Gmelin) (Homoptera: Aphididae) II: the nitrogen and sugar composition of ingested phloem sap and excreted honeydew. **Journal of Experimental Biology**, v. 35, n. 1, p. 74-84, 1958.

MONNERAT, R. G.; SOARES, C. M. S.; GOMES, A. C. M.; JONES, G.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.; BERRY, C. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* bacteria living inside of plants. **Microbial Bioechnology**, v. 2. p. 1560-1562, 2009.

MONNERAT, R.; SANTOS, R. C.; BARROS, P. C.; BATISTA, A. C.; BERRY, C. **Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão.** Comunicado Técnico 98, Out., 2003.

MUNTHALI, D.C.; TSHEGOFATSO, A. B. Factors Affecting Abundance and Damage Caused by Cabbage Aphid, *Brevicoryne brassicae* on Four Brassica Leafy Vegetables: *Brassica oleracea* var. *Acephala*, *B. chinense*, *B. napus* and *B. carinata*. **The Open Entomology Journal**, v. 8, p. 1-9, 2014.

ORTEGA-MORALES, B. O.; CHAN-BACAB, M., J.; ROSA-GARCIA, S. C.; CAMACHO-CHAB, J. C. Valuable processes and products from marine intertidal microbial communities. **Current Opinion in Biotechnology**, v.21: 346-352, 2010.

OSMAN, G.; MOSTAFA, S.; MOHAMED, S. H. Antagonistic and insecticidal activities of some *Streptomyces* isolates. **Pakistan Journal of Biotechnology**. v. 4, p. 65-71, 2007.

PACHECO, J. L.C. **Avaliação de actinobactérias e fungos com potencial entomopatogênico para controle de *Brevicoryne brassicae* (HEMIPTERA: APHIDIDAE).** Dissertação de Mestrado, UFPR, 2015.

PELL, J.K; HANNAM, J.J; STEINKRAUS, J.J. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **Biological Control**, v. 55, p.187-198, 2010.

POLETTI, M.; COLLETTE, L. de P.; OMOTO, C. Compatibilidade de agrotóxicos com os ácaros predadores *Neoseiulus californicus* (McGregor) e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). **BioAssay Piracicaba**, v.3(3), p.14, 2008.

PORSANI, M.V.; AMATUZZI, R. F.; OLIVEIRA, B. H.; BARATTO, L. C.; DALITZ, C. A.; BOZZA, A.; MARANGONI, P. R.; DALZOTO, P.R.; KOLM, H. E.; PIMENTEL, I. Antimicrobial potential of fungi and actinobacteria isolated from sandy sediments of intertidal regions. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3(3) p.899-913, 2013.

PRAÇA, L. B.; GOMES, A. C. M. M.; CABRAL, G.; MARTINS, E.; SUJII, E. H.; MONNERAT, R. G. Endophytic Colonization by Brazilian Strains of *Bacillus thuringiensis* on Cabbage Seedlings Grown in Vitro. **Bt Research**, v.3, N.3, p.11-19, 2012.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.; XU, L. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p 457-573, 2011.

QINQ-FEI, Z.; CHUAN-HAO, L.; HUI-QIN, H.; ZHE, F.; SHI-XIANG, B. Screening and identification of nematicidal actinomycetes and optimization of ferment conditions. **Chinese Journal of Biological Control**, v. 25, n. 3, p. 255-259, 2009.

QUARCCO, F.; BONSI, C.; TACKIE, N. Pesticides - Toxic Aspects- chapter 4. Pesticides, the Environment, and Human Health. **George Washington Carver Agriculture Experiment Station**. DOI: 10.5772/57553, 2014.

SNEH, B.; GROSS, S.; GASITH, A. Biological control of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep., Noctuidae) by *Bacillus thuringiensis* subsp. entomocidus and *Bracon hebetor* Say (Hym., Braconidae). **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**. v.96, p.408-412, 1983.

SUNDARAPANDIAN, S.; SUNDARA, M. D.; THOLKAPPIAN, P.; BALASUBRAMANIAN, V. Mosquitocidal properties of indigenous fungi and actinomycetes against *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Biological Control**, v.16, p. 89-91, 2002.

TAMURA, S.; TAKAHASHI, N.; MIYAMOTO, S.; MORI, R.; SUZUKI, S.; NAGATSU, J. Isolation and physiological activiti of piericidin A, A natural insecticide produced by *Streptomyces*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 576 – 582, 1963.

VENDRAMIM, J.D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. In: CASTIGLIONI, E. (Ed.). **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: Pallotti. p.113-128, 2000.

VIJAYABHARATHI, R.; KUMARI, B. R.; SATHYA, A.; SRINIVAS, V.; ABHISHEK, R.; SHARMA, H. R.; GOPALAKRISHNAN, S. Biological activity of entomopathogenic actinomycetes against lepidoperam insects (Lepidoptera: Noctuidade). **Canadian Journal Plant Science**, v. 94, n. 4, p. 759-769, 2014.

WANG, X. J.; WANG, J.; HUANG, S. X.; CHENB, Y, H.; LIU, C, X. XIANG, W, S. Four New Doramectin Congeners with Acaricidal and Insecticidal Activity from *Streptomyces avermitilis* NEAU1069. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 2117-2125, 2011.

WILKINSON, T. L.; DOUGLAS, A. E. Aphid Feeding, as Influenced by Disruption of the Symbiotic Bacteria: an Analysis of the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*). **Journal Insect Physiology**, v. 41, n. 8, p. 635-640, 1995.

ZAR, J. H. **Biostatystical Analysis**. 5 ed. Prentice Hall, 2009.

APÊNDICE

TABELA 1 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA AS SEGUINTE LINHAGENS PATOGÊNICAS: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) E *Candida albicans* (ATCC 10231)

nº	Isolados	<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
1	AD G25 7A 40	++	-	-	-
2	AS G25 3A 49	+	-	-	+
3	AD G27 13A 68	++	-	-	-
4	AD G27 12B 83	+	-	-	+
5	AD G28 6B 47	+	-	-	+
6	AD G31 3A 13	+	-	-	+++
7	AD G31 3A 18	-	-	-	++
8	AD G31 3A 19	+	-	-	++
9	AD G31 6A 34	-	+	-	++
10	AS G31 5A 43	+++	-	-	++
11	AS G31 3A 72	-	-	-	++
12	AS G31 3B 16	-	+	-	++
13	AD G32 4A 29	+	-	-	-
14	AD G32 11A 60	-	-	-	++
15	AS G32 3A 74	+	-	-	+++
16	AD G33 3A 16	+	-	-	++
17	AD G34 11B 78	++	-	-	-
18	AD G34 12B 82	+	+	+	+++
19	AS G34 3B 18	++	-	-	+++
20	AD G35 3A 15	+	+	-	++
21	AD G35 3A 20	+	+	-	++
22	AD G35 3A 22	-	+	-	-
23	AD G35 3A 23	+	-	-	+++
24	AD G35 3A 25	+	-	-	+++
25	AD G35 3A 28	+	+	-	++
26	AD G35 3A 30	-	+	-	-
27	AD G35 3A 31	+	-	-	++
28	AD G35 3A 33	+	-	-	++
29	AD G35 4A 30	+	-	-	+++
30	AD G35 6B 46	+++	-	-	-
31	AD G35 8A 45	+	+	-	++
32	AD G35 12A 65	+	-	-	+++
33	AD G35 13B 84	+	+	-	+
34	AS G35 3A 11	+	-	-	+++
35	AS G35 3A 27	+	-	-	++
36	AS G35 3A 28	-	-	-	+
37	AS G35 3A 30	+	-	-	+++
38	AS G35 3A 32	-	-	-	+
39	AS G35 3A 33	+	-	-	++
40	AS G35 3A 37	+	-	-	+++
41	AS G35 3A 42	+	-	-	+++
42	AS G35 3A 43	+	++	-	++
43	AS G35 3A 47	+	-	-	+++
44	AS G35 3A 57	+	-	-	+++
45	AD ----- 3B 17	+++	+	-	+
46	AD ----- 7A 41	+++	+	+	+++
47	AD ----- 11B 76	++	+	+	+
48	AS G35 3A 34	+	-	-	++
49	AS G35 3A 38	+	-	-	++
50	AS G35 3A 41	+	-	-	++
51	AS G35 3A 40	+	-	-	++
52	AD G35 3B 14	+	-	-	++
53	AS G35 3A 46	+	-	-	++
54	AS G35 3A 49	+	-	-	+++
55	AD G35 3A 38	+	-	-	++
56	AD G35 3A 29	+	-	-	++
57	AD G35 3A 34	+	-	-	++
58	AD G35 3A 40	+	-	-	+++
59	AS G35 3A 36	+	-	-	++

Continuação tabela 1					
nº	Isolados	<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
60	AD G35 3A 37	+	-	-	+++
61	AS G35 12B 99	+	-	-	+++
62	AD G35 3A 41	+	-	-	+++
63	AS G35 3A 73	+	-	-	+++
64	AD G35 3A 24	-	-	-	+++
65	AS G35 3A 67	+	-	-	++
66	AS G35 3A 77	+	-	-	++
67	AS ----- 3A 26	+	-	-	+++
68	AS ----- 3A 31	-	-	-	+
69	AS G35 3A 66	-	-	-	++
70	AD ----- 3A 26	-	-	-	+++
71	AS ----- 3A 56	+	-	-	+++
72	AS G35 3A 71	-	-	-	+
73	AS ----- 3A 71'	++	-	-	-
74	AD G31 13A 69	+	-	-	-
75	AS ----- 3A 42	-	-	-	++
76	AS G35 3A 80	-	-	-	++
77	AS G35 3A 60	-	-	-	+
78	AS G35 3A 41	+	-	-	++
79	AS ----- 3A 34	+	-	-	+

Legenda: AD: Isolado cultivado em meio Czapeck Dox realizado com água destilada. AS: Isolado cultivado em meio Czapeck Dox salino. G25 à G35: morfotipos dos isolados de actinobactérias do gênero *Streptomyces* e *Nocardia*. Pontos 1A à 15A e 1B à 15B pontos de coleta nas quinze estações de FONTE: O autor (2010)

NOTA: +: formação de halo de inibição < 15mm de diâmetro; ++: formação de halo de inibição > ou = 15 mm de diâmetro; +++: formação de halo de inibição > ou = 20 mm de diâmetro.

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOLÓGICAMENTE ATIVAS

Central Composite Design (CCD)

Factors: 3 Replicates: 2
Base runs: 20 Total runs: 40
Base blocks: 1 Total blocks: 1

Two-level factorial: Full factorial

Cube points: 16
Center points in cube: 12
Axial points: 12
Center points in axial: 0

Alpha: 1,68179

Response Surface Regression: Biomass versus pH; Temperature; Time

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for Biomass

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,321381	0,013790	23,306	0,000
pH	0,019272	0,009149	2,106	0,044
Temperature	-0,000536	0,009149	-0,059	0,954
Time	-0,007774	0,009149	-0,850	0,402
pH*pH	-0,062475	0,008906	-7,015	0,000
Temperature*Temperature	-0,068468	0,008906	-7,688	0,000
Time*Time	-0,056580	0,008906	-6,353	0,000
pH*Temperature	-0,026687	0,011954	-2,233	0,033
pH*Time	-0,024900	0,011954	-2,083	0,046
Temperature*Time	0,042762	0,011954	3,577	0,001

S = 0,0478152 PRESS = 0,133780
R-Sq = 83,48% R-Sq(pred) = 67,77% R-Sq(adj) = 78,52%

Analysis of Variance for Biomass

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	0,346509	0,346509	0,038501	16,84	0,000
Linear	3	0,011803	0,011803	0,003934	1,72	0,184
pH	1	0,010145	0,010145	0,010145	4,44	0,044
Temperature	1	0,000008	0,000008	0,000008	0,00	0,954
Time	1	0,001651	0,001651	0,001651	0,72	0,402
Square	3	0,284132	0,284132	0,094711	41,43	0,000
pH*pH	1	0,076877	0,112499	0,112499	49,21	0,000
Temperature*Temperature	1	0,114986	0,135116	0,135116	59,10	0,000
Time*Time	1	0,092269	0,092269	0,092269	40,36	0,000
Interaction	3	0,050574	0,050574	0,016858	7,37	0,001
pH*Temperature	1	0,011396	0,011396	0,011396	4,98	0,033
pH*Time	1	0,009920	0,009920	0,009920	4,34	0,046
Temperature*Time	1	0,029258	0,029258	0,029258	12,80	0,001
Residual Error	30	0,068589	0,068589	0,002286		
Lack-of-Fit	5	0,038780	0,038780	0,007756	6,50	0,001
Pure Error	25	0,029809	0,029809	0,001192		
Total	39	0,415098				

Unusual Observations for Biomass

Obs	StdOrder	Biomass	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
2	2	0,350	0,256	0,028	0,094	2,41 R
13	13	0,049	0,174	0,026	-0,125	-3,14 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Estimated Regression Coefficients for Biomass using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-2,55497
pH	0,773887
Temperature	0,0458184
Time	0,0536894
pH*pH	-0,0624752
Temperature*Temperature	-6,84680E-04
Time*Time	-0,00353623
pH*Temperature	-0,00266875
pH*Time	-0,00622500
Temperature*Time	0,00106906